

Università di Pisa

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrine e Metaboliche

Tesi di Dottorato

Identificazione e caratterizzazione genotipica e fenotipica
dei soggetti a rischio di diabete

Relatore:

Prof. Del Prato Stefano

Candidata:

Dott.ssa Bianchi Cristina

Anno Accademico 2009-2010



Indice

| | |
|---|----|
| <u>Sezione introduttiva</u> | 4 |
| Epidemiologia del diabete tipo 2 e delle alterazioni minori della regolazione glicemica | 5 |
| Definizione del rischio | 8 |
| • Età | 9 |
| • Storia familiare/predisposizione genetica | 9 |
| • Etnia | 10 |
| • Storia di diabete gestazionale | 10 |
| • Sindrome dell'ovaio policistico | 10 |
| • Sovrappeso/obesità | 10 |
| • Sedentarietà | 11 |
| • Alterazioni dello sviluppo intrauterino/Nascita prematura | 12 |
| • Alterata regolazione glicemia | 12 |
| • Sindrome metabolica | 14 |
| • Farmaci diabetogeni | 16 |
| • Fattori dietetici | 16 |
| • Ambiente favorente obesità/diabete | 16 |
| • Depressione | 17 |
| • Basso stato socio-economico | 17 |
| • Infiammazione cronica di basso grado | 17 |
| • Alterata funzionalità epatica | 20 |
| Basi genetiche del diabete tipo 2 | 23 |
| • PPAR- γ | 25 |
| • KCNJ11 – KCNQ1 | 26 |
| • ENPP1 | 26 |
| • WSF1 | 27 |
| • CAPN10 | 27 |
| TCF7L2: il gene maggiormente associato al diabete tipo 2 | 33 |
| Interazione geni-ambiente | 36 |
| Storia naturale del diabete tipo 2 | 40 |
| • Insulino-resistenza | 41 |
| • Deficit di secrezione β -cellulare | 42 |
| • Concentrazioni di glucosio nelle alterazioni minori della regolazione glicemica | 43 |
| • Insulino-resistenza nelle alterazioni minori della regolazione glicemica | 43 |
| • Secrezione insulinica nelle alterazioni minori della regolazione glicemica | 45 |
| Diabete, disglicemia e rischio cardiovascolare | 46 |
| Screening del diabete | 51 |
| Strumenti per lo screening del diabete e per l'identificazione dei soggetti a rischio | 54 |
| Definizione della popolazione target per la prevenzione del diabete | 59 |

| | |
|---|-----|
| Prevenzione del diabete | 61 |
| Riduzione del rischio cardiovascolare nei soggetti con disglycemia | 72 |
| Bibliografia sezione introduttiva | 74 |
| <u>Sezione sperimentale</u> | 95 |
| Introduzione | 96 |
| Obiettivi dello studio | 97 |
| Pazienti, materiali e metodi | 98 |
| Risultati | 102 |
| • Prevalenza delle differenti classi di alterata regolazione glicemica e di diabete tipo 2 non noto | 102 |
| • Performance del questionario FINDRISC nell'identificazione dei soggetti con alterata regolazione glicemica o diabete tipo 2 non noto | 103 |
| • Glicemia, insulino-resistenza e secrezione insulinica nei soggetti a rischio di diabete | 106 |
| • Caratteristiche metaboliche dei soggetti a rischio di diabete tipo 2 | 113 |
| • γ -glutamyltransferasi, regolazione glicemica e profilo di rischio cardiovascolare | 118 |
| • Effetto dei geni candidati sulla funzione β -cellulare e sulla sensibilità insulinica | 120 |
| Discussione | 125 |
| Conclusioni | 137 |
| Bibliografia sezione sperimentale | 138 |
| <u>Appendice</u> | 145 |
| • Del Parto S, Bianchi C, Miccoli R, Penno G. <i>Pharmacological intervention in prediabetes: considering the risks and benefits</i> . Diabetes Obesity and Metabolism, 2007; 9 (Suppl 1): 17-22. | |
| • Bianchi C, Penno G, Romero F, Del Prato S, Miccoli R. <i>Treating the metabolic syndrome</i> . Expert Rev Cardiovasc Ther 2007; 5: 491-506. | |
| • Bianchi C, Penno G, Daniele G, Benzi L, Del Prato S, Miccoli R. <i>Optimizing management of metabolic syndrome to reduce risk: focus on life-style</i> . Intern Emerg Med 2008; 3: 87-98. | |
| • Bianchi C, Miccoli R, Penno G, Del Prato S. <i>Primary prevention of cardiovascular disease in people with dysglycemia</i> . Diabetes Care 2008;31 Suppl 2: S208-S214. | |
| • Miccoli R, Bianchi C, Penno G, Del Prato S. <i>Insulin resistance and lipid disorders</i> . Future Lipidol 2008, 3(6): 651-664. | |
| • Bianchi C, Penno G, Crisci I, Daniele G, Agostini A, Del Prato S, Miccoli R. <i>Serum gamma-glutamyltransferase levels are related to insulin sensitivity and secretion in subjects with abnormal glucose regulation</i> . Diabetes Metabolism Research and Review 2010, 26(3):181-186. | |

Il diabete mellito tipo 2 (DM2) è una delle malattie croniche più comuni nel mondo, la cui prevalenza è in continua ascesa. Si stima che attualmente il 6.4% della popolazione adulta (20-79 anni) sia affetta da DM2, per un totale di 285 milioni di persone (1). Le proiezioni al 2030 sono ancora più allarmanti dato che si prevede un incremento del 54% della prevalenza del DM2 che dovrebbe quindi interessare il 7.7% della popolazione mondiale, pari a 439 milioni di individui (Fig. 1). In Europa circa 55 milioni di persone sono affette da DM2 e si prevede che il numero di diabetici salirà a 66 milioni nel 2030 se non verranno implementate adeguate strategie di prevenzione.

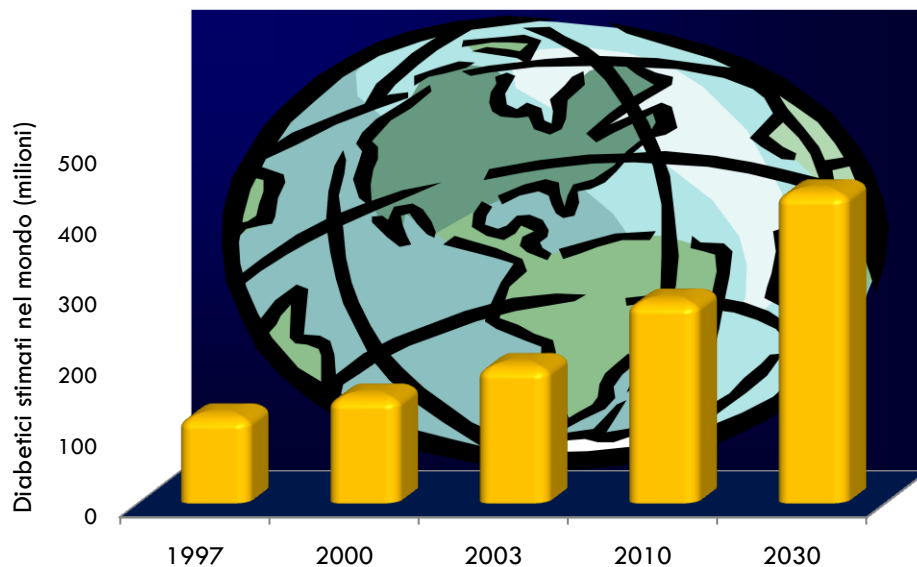


Figura 1. Stime della prevalenza del diabete nel mondo e proiezioni al 2030 secondo l'*International Diabetes Federation*.

Nel nostro paese si calcola che 2 milioni di persone hanno il DM2, con un'incidenza annua di 150 mila nuovi casi, e che un altro milione non sa di averlo. La prevalenza di DM2 è aumentata progressivamente dal 2.8% nel 1988 al 3.9% nel 2000 (2). Inoltre, stime derivate dallo studio di Brunico, prevedono che tra 10 anni si avrà un incremento netto di un milione di casi di DM2 (3). L'incremento è tuttavia particolarmente evidente negli anziani, che rappresentano ora i 2/3 della popolazione diabetica. Secondo i dati ISTAT la prevalenza del DM2 in Italia nel 2009 si assestava intorno al 4.8% (5% nelle donne e

4.6% negli uomini), pari a circa 2.900.000 persone (Fig. 2). Questi risultati mostrano un aumento rispetto all'indagine eseguita nel 1999-2000, secondo cui la prevalenza del DM2 in Italia era pari al 3,7% (4% nelle donne e 3.5% negli uomini). La prevalenza del DM2 aumenta con l'età fino ad arrivare al 18.9% nelle persone con età ≥ 75 anni. Per quanto riguarda la distribuzione geografica, la prevalenza è più alta nel Sud e nelle Isole, con una prevalenza del 5.5%, seguiti dal Centro con il 4.9% e dal Nord Italia con il 4.2% (www.epicentro.iss.it).

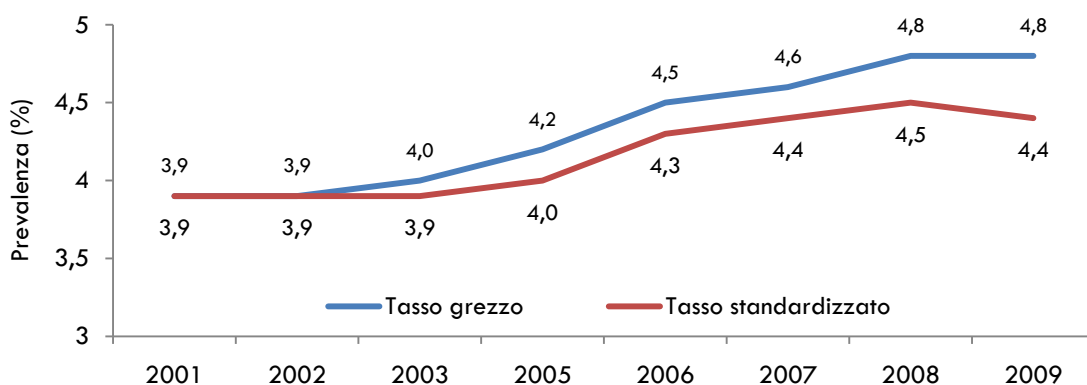


Figura 2. Andamento della prevalenza del diabete in Italia (dati ISTAT). Il tasso standardizzato tiene conto del cambiamento nella composizione per età e sesso della popolazione italiana nel corso degli anni.

Le ragioni di questa “pandemia” sono molteplici e non tutte note. L’invecchiamento della popolazione può spiegare solo parzialmente questo fenomeno. Nonostante esista una predisposizione genetica allo sviluppo di DM2, fattori ambientali e stile di vita sarebbero i principali responsabili dell’aumentata prevalenza della malattia nel corso di questi anni. Sicuramente un ruolo importante è giocato dal processo di “occidentalizzazione” dello stile di vita, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, dove si registra una crescente urbanizzazione, riduzione dell’attività fisica, eccessivo introito calorico e conseguente sviluppo di sovrappeso e obesità

Rispetto alla popolazione generale, le persone affette da DM2 hanno un rischio di sviluppare malattie cardiovascolari da 2 a 4 volte più alto e nei 2/3 dei casi muoiono proprio a causa di eventi cardiovascolari. D’altra parte un aumentato rischio cardiovascolare è presente anche nei soggetti con alterazioni minori della regolazione glicemica (disglicemia) (4) e/o con sindrome metabolica (SM) (5). Pertanto il DM2 e le sue complicanze hanno un enorme impatto sia sul singolo individuo sia sulla società.

Anche i costi economici e sociali del DM2 e delle sue complicanze sono elevati continueranno a crescere (6). Si stima che i costi diretti per questa malattia, che rappresentano il 30% dei costi totali della società, ammonteranno a circa 70 bilioni di € per anno nel 2010.

Per tutti questi motivi una sempre maggiore attenzione dovrebbe essere posta alla diagnosi precoce, all'identificazione dei soggetti a rischio di DM2, alla prevenzione del DM2 e delle sue complicanze. Esistono forti evidenze, derivanti da studi clinici controllati, che il DM2 può essere prevenuto mediante un intervento basato su minime modifiche dello stile di vita. La possibilità di prevenire il DM2 rappresenta, quindi, una grande opportunità per le singole persone e per la società.

Definizione del rischio

La prevenzione delle malattie, compreso il DM2, fonda le sue basi sull'identificazione di una serie di elementi, fattori di rischio, la cui presenza e intensità si associa con una maggiore probabilità di sviluppare la malattia stessa. I fattori di rischio, ampiamente diffusi nella popolazione, agiscono in un continuum progressivamente crescente e sembrano potenziarsi a vicenda. Studi osservazionali hanno, infatti, dimostrato che il rischio globale di un individuo in cui coesistono più fattori di rischio è la conseguenza di una relazione esponenziale e non puramente additiva. Di conseguenza, risulta rilevante il vantaggio che si può ottenere dalla concomitante correzione di più fattori di rischio. Ampi studi epidemiologici e clinici hanno consentito di individuare i principali fattori di rischio per il DM2, in grado di promuovere i processi fisiopatologici alla base della comparsa della malattia e di favorirne la progressione. Ai fattori di rischio *non-modificabili* quali età, sesso e fattori genetici, si affiancano i fattori di rischio *modificabili* quali obesità, soprattutto viscerale, abitudini alimentari e attività fisica, stato socio-economico (Tab.1). Tuttavia, per una migliore identificazione dei soggetti a rischio di DM2, l'attenzione dei ricercatori si è rivolta anche su altri fattori, definiti *emergenti*, come gli indici di infiammazione e gli enzimi epatici.

Tabella 1. Fattori di rischio tradizionali per il diabete tipo 2

| Fattori di rischio non-modificabili | Fattori di rischio modificabili |
|---|---|
| Età | Sovrappeso/obesità |
| Storia familiare/Predisposizione genetica | Sedentarietà |
| Etnia | Alterazioni dello sviluppo intrauterino/Nascita prematura |
| Storia di diabete gestazionale (GDM) | Alterata glicemia a digiuno/Ridotta tolleranza ai carboidrati |
| Sindrome dell'ovaio policistico | Sindrome metabolica |
| | Fattori dietetici |
| | Farmaci diabetogeni |
| | Depressione |
| | Ambiente favorente obesità/diabete |
| | Basso stato socio-economico |

- Età. L'invecchiamento è uno dei più forti fattori di rischio per il DM2 (Fig. 3). I dati epidemiologici del DECODE (*Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe*), relativi a 13 studi epidemiologici, indicano che la prevalenza del DM2 aumenta con l'avanzare dell'età fino all'ottava decade (7). Mentre la glicemia a digiuno aumenta solo in misura modesta con l'aumentare dell'età, la glicemia a 2 ore dal carico orale di glucosio (OGTT = *Oral Glucose Tolerance Test*) aumenta in misura più marcata con l'età, soprattutto dopo i 50 anni e maggiormente nelle donne. Nella popolazione di mezz'età la prevalenza della ridotta tolleranza ai carboidrati (IGT = *impaired glucose tolerance*) e dell'alterata glicemia a digiuno (IFG = *impaired fasting glucose*) è pari al 15% circa, mentre in età geriatrica la prevalenza dell'alterata regolazione glucidica sale al 35-40%. Negli ultimi anni, però, l'età di comparsa del DM2 si è ridotta considerevolmente nei paesi in cui la prevalenza dell'obesità è aumentata in misura significativa (8). Ad esempio, nella popolazione pediatrica il DM2 rappresenta il 50% dei nuovi casi di diabete.

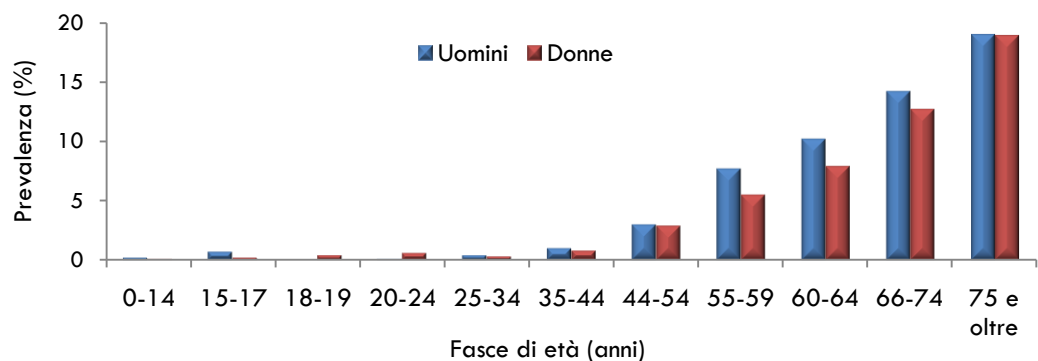


Figura 3. Prevalenza del diabete (tipo 1 e tipo 2) in Italia per fasce d'età (dati ISTAT 2009).

- Storia familiare/predisposizione genetica. Nei gemelli omozigoti la concordanza di malattia è estremamente elevata (60-90%) (9), ma si riduce nei gemelli dizigoti (17-37%) (10). I figli di un genitore diabetico hanno circa il 40% di possibilità di sviluppare il DM2 (mentre nella popolazione generale il rischio di sviluppare DM2 è solo del 7%) (11).

Negli ultimi anni gli studi genetici di popolazione (GWAS = *Genome-Wide Association Studies*) hanno consentito di individuare una serie di varianti geniche, collegate soprattutto alla funzione β -cellulare più che all'insulino-resistenza, responsabili di un

aumento della suscettibilità al DM2. L'effetto sul rischio di DM2 per l'allele di suscettibilità varia fra il 10% e il 40%. Globalmente, però, queste varianti spiegano meno del 10% della componente genetica del DM2 (12).

- Etnia. Studi condotti in popolazioni multiethniche suggeriscono che alcuni gruppi etnici hanno una particolare predisposizione a sviluppare insulino-resistenza e DM2 quando esposti a condizioni favorevoli. In particolare gli Ispanici, gli Afroamericani e gli Indiani Asiatici hanno una più alta prevalenza di DM2 rispetto ai Caucasici (13).
- Diabete gestazionale (GDM). Esiste una forte correlazione fra storia di GDM e successivo sviluppo di DM2 (14). Una recente meta-analisi di 20 studi riporta che le donne con storia di GDM hanno un rischio 7.5 volte più alto di sviluppare DM2 rispetto alle donne normoglicemiche in gravidanza (15).
- Sindrome dell'ovaio policistico. Molte donne con sindrome dell'ovaio policistico presentano un maggior grado di insulino-resistenza e di alterazione della funzione β -cellulare rispetto a donne di controllo di pari età e BMI (16). Approssimativamente il 30% delle donne con sindrome dell'ovaio policistico ha IGT e più del 10% DM2 (17). Negli USA si calcola che il 40% delle donne con sindrome dell'ovaio policistico sviluppa DM2 dopo i 40 anni d'età (18), tale percentuale è ancora maggiore in presenza di obesità. La sindrome dell'ovaio policistico aumenta notevolmente anche il rischio di GDM come dimostrano anche i dati di una recente meta-analisi (Odds Ratio - OR 2.94; 95% IC: 1.70-5.08) (19).

Sovrappeso/obesità. Il sovrappeso (BMI compreso fra 25 e 30 Kg/m²) e l'obesità (BMI ≥ 30 Kg/m²) aumentano il rischio di sviluppare DM2 (Fig. 4) a tutte le età (20). L'accumulo di tessuto adiposo, soprattutto nella regione addominale, può contribuire allo sviluppo del DM2 sia mediando il metabolismo degli acidi grassi sia attraverso la secrezione di adipochine e citochine che intervengono in svariati processi quali la regolazione dell'appetito, l'insulino-sensibilità, l'infiammazione e l'aterosclerosi. Il grado di insulino-resistenza e l'incidenza del DM2 sono maggiori in coloro che hanno una distribuzione centrale (addominale) dell'adipe (21).

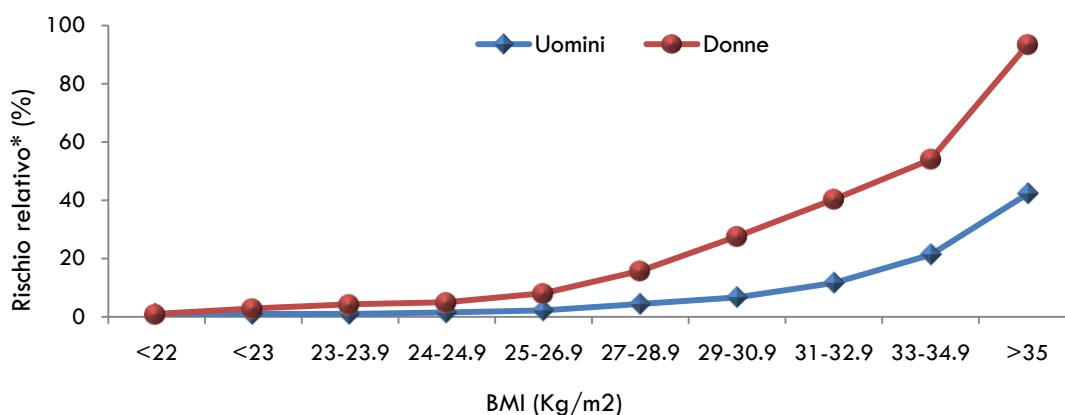


Figura 4. Relazione fra obesità e rischio di sviluppare diabete tipo 2 negli uomini e nelle donne. * Rischio aggiustato per età.

- **Sedentarietà.** Recenti dati suggeriscono che la vita sedentaria aumenta il rischio di sviluppare DM2. Nel *Nurses' Health Study*, condotto su 84941 infermiere con un *follow-up* medio di 16 anni, si osservava una riduzione del rischio di sviluppare DM2 con il progressivo aumento delle ore di attività fisica svolte nella settimana (Fig. 5; 22).

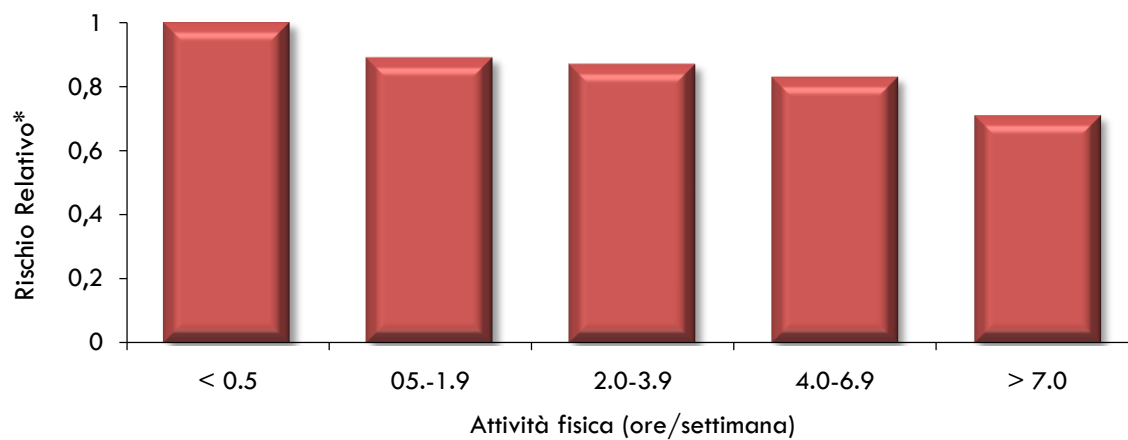


Figura 5. Rischio di sviluppare diabete in relazione all'attività fisica. *Nurses' Health Study*. * Rischio aggiustato per età.

Nell'ambito dello stesso studio si osservava anche che il numero di ore/settimana spese a guardare la TV, indice indiretto di sedentarietà, si associava ad un aumento del rischio di sviluppare DM2 (Fig. 6; 23).

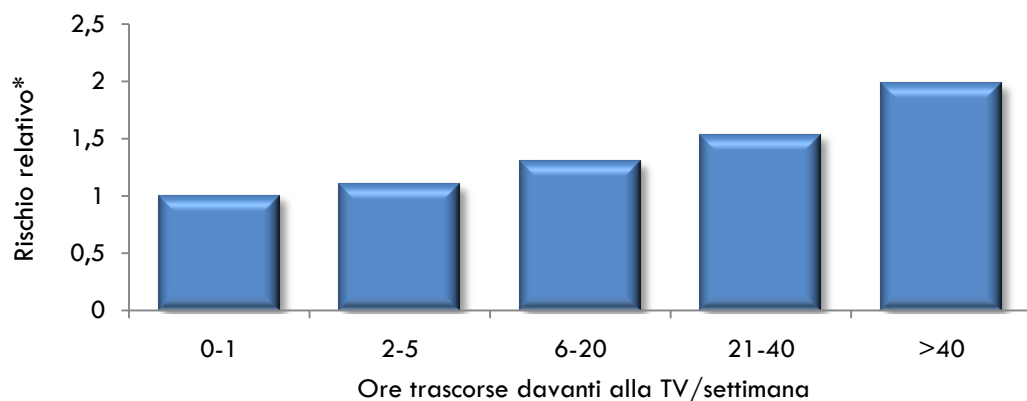


Figura 6. Rischio di sviluppare diabete tipo 2 in relazione al numero di ore/settimana trascorse a guardare la TV. *Nurses' Health Study*. * Rischio aggiustato per età.

- Alterazioni dello sviluppo intrauterino/Nascita prematura. Esiste un'associazione inversa tra il peso alla nascita e il rischio di DM2. In particolare, i neonati che hanno alla nascita un peso più basso di quello previsto per l'età gestazionale (<10° percentile per età gestazionale) presentano, in età adulta, riduzione della funzione β -cellulare, insulino-resistenza ed un aumentato rischio di sviluppare DM2 (24). Anche i neonati macrosomici (peso alla nascita >90° percentile per età gestazionale) presentano un rischio più elevato di sviluppare DM2 in età adulta (25). Una meta-analisi di 14 studi documenta l'esistenza di una relazione con curva ad U fra peso alla nascita e rischio di DM2 in età adulta con un OR di 1.36 per la macrosomia e di 1.47 per il basso peso alla nascita (26). Anche la nascita prematura, indipendentemente dal peso, aumenta il rischio di sviluppare DM2 (27).
- Alterata regolazione glicemica. IFG e IGT sono le più precoci alterazioni della regolazione glicemica che precedono il DM2 e per tale motivo sono spesso definite "pre-diabete". L'IFG è definita come glicemia a digiuno compresa nell'intervallo fra 110 mg/dl e 125 mg/dl (o come più recentemente proposto dall'*American Diabetes Association* - ADA fra 100 mg/dl e 125 mg/dl), mentre l'IGT è definito come glicemia alla seconda ora di un OGTT compresa nell'intervallo 140-199 mg/dl (Tab. 2). IFG e IGT sembrano rappresentare differenti alterazioni metaboliche (28-29).

Tabella 2. Variazione dei criteri diagnostici per le alterazioni minori della regolazione glucidica secondo l'*American Diabetes Association* (ADA).

| | ADA 1997 | ADA 2003 |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Diabete mellito tipo 2 | | |
| Glicemia a digiuno | ≥ 126 mg/dl | ≥ 126 mg/dl |
| Glicemia 2h OGTT | ≥ 200 mg/dl | ≥ 200 mg/dl |
| IGT | | |
| Glicemia a digiuno | < 110 mg/dl | < 100 mg/dl |
| Glicemia 2h OGTT | ≥ 140 mg/dl e < 200 mg/dl | ≥ 140 mg/dl e < 200 mg/dl |
| IFG | | |
| Glicemia a digiuno | ≥ 110 mg/dl e < 126 mg/dl | ≥ 100 mg/dl e < 126 mg/dl |
| Glicemia 2h OGTT | < 140 mg/dl | < 140 mg/dl |
| NGT | | |
| Glicemia a digiuno | < 110 mg/dl | < 100 mg/dl |
| Glicemia 2h OGTT | < 140 mg/dl | < 140 mg/dl |

La prevalenza di IFG e IGT varia considerevolmente nei diversi gruppi etnici ed aumenta con l'età (Fig. 7). L'IGT è più comune nelle donne (7).

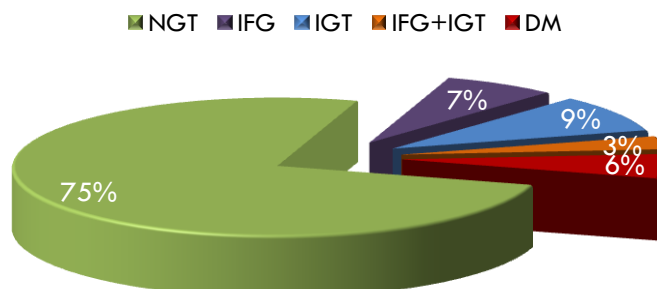


Figura 7. Prevalenza delle alterazioni minori della regolazione glucidica nel DECODE.

Una recente meta-analisi di 44 studi non ha evidenziato differenze nel rischio di DM2 nei soggetti con IFG rispetto a quelli con IGT, ma ha concluso che i soggetti che presentano entrambe le alterazioni hanno rischio più elevato di sviluppare DM2 rispetto a coloro che presentano un'alterazione isolata (30). In particolare si stima un rischio relativo (RR) annuale di progressione verso il DM2 pari a 5.55 per gli IFG, 6.02 per gli IGT e 12.21 per gli IFG+IGT. Si deve sottolineare, però, che nella maggioranza dei lavori presenti in letteratura la definizione di IFG rispecchia i vecchi criteri diagnostici

con soglia glicemica a 110 mg/dl, mentre restano ancora da valutare i rischi associati alla riduzione della soglia per IFG a 100 mg/dl proposta nel 2003 dall'ADA.

Sulla base dei dati disponibili, si stima che la maggioranza (~70%) dei soggetti con disglycemia svilupperà DM2 (31). Tuttavia, gli studi di più breve durata hanno documentato che in un periodo di 3-5anni circa il 25% dei soggetti con disglycemia progredisce verso il DM2, un 25% ritorna ad avere una normale tolleranza glucidica e il 50% permane nello stato di disglycemia (32).

- **Sindrome metabolica (SM).** La SM è definita come un cluster di alterazioni metaboliche e fattori di rischio cardiovascolari associati all'insulino-resistenza, anche se si discute ancora sui meccanismi fisiopatologici alla base della sindrome. Altrettanto discussi sono anche i criteri diagnostici e numerose sono le definizioni proposte dalle varie società scientifiche (Tab. 3; 29, 34-35). Indipendentemente dai criteri diagnostici impiegati, la presenza di SM è un forte predittore di sviluppo di DM2 (36).

Tabella 3. Criteri diagnostici per la Sindrome Metabolica. UAE = *Urinary Albumin Excretion* (escrezione urinaria di albumina); ACR = rapporto urinario albumina/creatinina.

| | AHA-NHBLI-IDF (35) | IDF (34) | NCEP-ATPIII (33) | OMS (29) |
|-------------------------------|--|---|--|--|
| Anomalia | Qualsiasi combinazione di 3 anomalità | Obesità centrale e 2 ulteriori anomalità | Qualsiasi combinazione di 3 anomalità | Alterazioni glicemiche o insulino-resistenza e 2 ulteriori anomalità |
| Alterazioni glicemiche | FPG > 100 mg/dl o diabete noto | FPG > 100 mg/dl o diabete noto | FPG > 100 mg/dl o diabete noto | FPG > 100 mg/dl o IGT o diabete noto |
| Insulino-resistenza | | | | M-clamp nel quartile inferiore della popolazione |
| Obesità centrale | Circonferenza addominale ≥102 cm nell'uomo e ≥ 88 cm nella donna | Circonferenza addominale ≥94 cm nell'uomo caucasico ≥80 cm nella donna caucasica (differenti cut-off per altre etnie) | Circonferenza addominale ≥102 cm nell'uomo e ≥88 cm nella donna | Rapporto vita/fianchi >0,90 nell'uomo e >0,85 nella donna e/o BMI ≥30 |
| Iperensione arteriosa | Sistolica ≥130 e/o diastolica ≥85 mmHg e/o trattamento antipertensivo | Sistolica ≥130 e/o diastolica ≥85 mmHg e/o trattamento antipertensivo | Sistolica ≥130 e/o diastolica ≥85 mmHg | Sistolica ≥140 e/o diastolica ≥90 mmHg |
| Ipertrigliceridemia | ≥ 150 mg/dl o terapia ipolipemizzante | ≥ 150 mg/dl o terapia ipolipemizzante | ≥150 mg/dl | |
| Basso colesterolo HDL | <40 mg/dl nell'uomo e <50 mg/dl nella donna, o trattamento ipolipemizzante | <40 mg/dl nell'uomo e <50 mg/dl nella donna, o trattamento ipolipemizzante | <40 mg/dl nell'uomo e <50 mg/dl nella donna, o trattamento ipolipemizzante | |
| Dislipidemia | | | | Trigliceridi ≥ 150 mg/dl e/o HDL <35 mg/dl nell'uomo o HDL <39 mg/dl nella donna |
| Microalbuminuria | | | | UAE >20 µg/min o ACR >30 mg/g |

- Farmaci diabetogeni. Un gran numero di farmaci può causare DM2 in soggetti predisposti, fra questi glucocorticoidi, β -bloccanti, diuretici tiazidici, niacina, immunosoppressori, diazossido, farmaci antiretrovirali (37).
- Fattori dietetici. Le abitudini alimentari possono influenzare lo sviluppo di DM2, soprattutto se determinano un aumento del peso corporeo. Recentemente, anche la composizione della dieta è stata correlata al rischio di DM2 (38). In particolare, un basso consumo di fibre è stato associato in numerosi studi epidemiologici ad un aumento del rischio di DM2 (39). Più contraddittorie appaiono, invece, le evidenze relative al ruolo dell'indice glicemico nel rischio di sviluppare DM2 (40). Una recente meta-analisi di 37 studi prospettici evidenzia, tuttavia, che sia il basso consumo di fibre (RR 1.27; 95% IC: 1.12-1.45) sia l'elevato indice glicemico degli alimenti (RR 1.40; 95% IC: 1.23-1.59) si associano ad un incremento nel rischio di DM2 (41). Si deve tuttavia enfatizzare che i cibi ricchi in fibre sono solitamente a basso indice glicemico, ma non tutti i cibi a basso indice glicemico sono ricchi in fibre. Una dieta ricca in grassi saturi si associa ad un aumento del rischio di DM2 (42), così come il consumo di acidi grassi trans (43), mentre il consumo di acidi grassi monoinsaturi (44) e di ω -3 (45) appare protettivo nei confronti del DM2. Protettivo nei confronti del DM2 appare anche un consumo moderato di alcool (46), frutta e verdura (47), noci (48) e caffè (49).
- Ambiente favorente obesità/diabete. Nelle ultime decadi si è registrata nella popolazione generale un'alterazione dell'equilibrio energetico con conseguente aumento della prevalenza di obesità, determinata dalla drammatica riduzione dell'attività fisica e da variazioni nelle abitudini alimentari. Infatti, lo stile di vita è radicalmente cambiato negli ultimi cinquant'anni a causa di una sempre maggiore urbanizzazione e del sempre più frequente uso di veicoli e macchine a motore (50). È stato dimostrato, inoltre, che il grado di urbanizzazione (ad esempio, l'alta densità di residenti e l'ampia disponibilità di trasporti) è inversamente associato all'abitudine di camminare o usare la bicicletta (51). Allo stesso tempo, le città offrono limitati spazi verdi e poche opportunità per i bambini di giocare all'aria aperta, di conseguenza aumenta il tempo che essi trascorrono in casa utilizzando videogiochi o guardando la televisione (52).
Se da una parte la spesa energetica si è ridotta, dall'altra è aumentato l'introito calorico a causa di variazioni della natura stessa dei cibi, del sempre più frequente consumo di pasti fuori casa, e dell'esplosione della promozione e del marketing di

prodotti alimentari, associati ad una più facile reperibilità ed un più basso costo degli alimenti stessi (53). Al cambiamento delle abitudini alimentari hanno contribuito anche alcune variazioni nei costumi sociali. Ad esempio, è aumentato il numero delle famiglie in cui entrambi i genitori lavorano, con conseguente riduzione del tempo dedicato alla gestione della famiglia stessa e alla scelta degli alimenti. L'industria alimentare ha risposto a tali esigenze producendo e promuovendo cibi convenienti, ricchi di calorie, spesso precotti (54). L'aumentato consumo di questi alimenti si è associato ad una riduzione del consumo di pesce, frutta e verdura. Inoltre, le dimensioni delle porzioni sono notevolmente aumentate nelle ultime due decadi (55), così come il consumo pro capite di zucchero e grassi (56). Questo tipo di alimenti è divenuto di facile accesso anche per i bambini, sia nel *fast food* sia a scuola, così come in casa (57). Si è osservato che i bambini che mangiano nei *fast food* assumono un maggior numero di calorie e consumano meno frutta e verdura rispetto ai bambini che non frequentano tali ristoranti (58-59). Studi osservazionali condotti in adolescenti fra i 12 e i 18 anni d'età, fra gli anni '70 e '90 (60-61), hanno evidenziato da una parte una riduzione della percentuale di introito calorico di cibo consumato a casa e dall'altro un aumento della quota introdotta mangiando fuori casa. La proporzione delle calorie totali assunta a casa si è ridotta da 74.1% nel 1971-78, a 68.3% nel periodo 1989-91 e a 60.5% nel 1994-96. Allo stesso tempo, la percentuale di cibo consumata presso i *fast food* è aumentata dal 6.5% al 16.7% nel periodo 1971-78 al 1989-91. Di conseguenza anche la quantità di denaro spesa per mangiare fuori casa è aumentata, passando dal 25% della spesa totale per il cibo nel 1977-1978 al 40% nel 1995 (62). Un fenomeno simile si è registrato anche in Italia, con un aumento di 58.1 bilioni di euro nel 2005, corrispondenti ad un incremento del 2.6% rispetto all'anno precedente. E' stato inoltre stimato che nel 2008 il cibo consumato fuori casa rappresenterà il 36% del totale (www.ISTAT.it). Mangiare fuori casa, compresi ristoranti e *fast food*, è associato ad un ridotto apporto macro/micro-nutrienti, ad una peggiore qualità della dieta, ad una più alta densità calorica delle pietanze che facilita l'aumento del peso corporeo (63-65). In due differenti studi, nelle donne che mangiavano abitualmente al ristorante/*fast food* si registrava un maggior introito di calorie, grassi totali e saturi, colesterolo e sodio (66-67). Inoltre, nei giovani adulti dello studio CARDIA (*Coronary Artery Risk Development in Adults*), effettuato fra il 1985-1986 e il 2000-2001, il numero di accessi ai *fast food* risultava correlato con un aumento del peso corporeo e dell'insulino-resistenza, due dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di DM2 (68).

Anche il fumo di sigaretta contribuisce ad aumentare il rischio di DM2 agendo in modo negativo sia sull'insulino-resistenza (69) che sulla funzione β -cellulare (70). Nel *Nurses' Health Study* si osservava, ad esempio, un aumento del 34% del rischio di sviluppare DM2 in 16 anni di follow-up nelle infermiere che fumavano ≥ 15 sigarette/die rispetto alle non fumatrici (RR 1.34; 95% IC: 1.20-1.50) (22).

Contribuisce al rischio di DM2 anche la capacità degli xenobiotici di alterare il metabolismo glucidico e lipidico (71). Una forte correlazione è stata evidenziata anche fra DM2 e concentrazione sierica di inquinanti organici persistenti (POP = *Persistent Organic Pollutant*) (72) .

- Depressione. La depressione è un fattore di rischio per il DM2 come dimostrano i risultati di un'analisi di 9 studi longitudinali (73). E un recente studio inglese, condotto su 6111 soggetti non diabetici, ha documentato che la presenza di depressione aumenta il rischio di DM2 del 62% (HR aggiustato per confondenti 1.62; 95%IC: 1.15-2.29), questo rischio non sembra essere spiegato dall'uso di farmaci antidepressivi (74).
- Basso stato socio-economico. Esiste una associazione inversa fra stato socio-economico e DM2, con più alta prevalenza nei gruppi con basso reddito, tale dato è consistente nei diversi paesi sviluppati e in differenti gruppi etnici (75-76). Il processo alla base di questa osservazione non è completamente chiaro, ma l'associazione fra stato socio-economico e fattori di rischio per DM2, come obesità, fumo, dieta inappropriato e inattività fisica nel tempo libero, appare rilevante (77).
- Infiammazione cronica di basso grado. L'infiammazione cronica di basso grado potrebbe costituire parte di un *background* comune sia a patologie metaboliche come l'obesità, la SM (78) e il DM2 (79), che a patologie cardiovascolari (80). Infatti, non solo l'infiammazione è stata correlata alla presenza di tali condizioni patologiche, ma recenti studi ne hanno evidenziato le potenzialità nel predire lo sviluppo di patologie cardiovascolari e di DM2. Una delle prime osservazioni relative all'esistenza di una relazione fra indici di infiammazione e rischio di DM2 fu pubblicata nel 1999 da Schmidt et al. (81), aprendo così la ricerca sulla possibile utilità di alcuni marcatori dell'infiammazione come indicatori biologici utili per l'identificazione di soggetti a rischio di DM2. Nello studio ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*), dopo 7 anni di follow-up, si osservava che l'incidenza di DM2 risultava associata alla presenza di elevati livelli di

leucociti e fibrinogeno e a bassi livelli di albuminemia, anche dopo correzione per altri fattori di rischio (età, genere, etnia, glicemia, familiarità per diabete, attività fisica e fumo). Solo successivamente, sono stati presi in considerazione marcatori più sofisticati, come la Proteina C Reattiva (PCR) e l'interleuchina-6 (IL-6). Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione fra elevati livelli di PCR e patologia cardiovascolare e SM (incluse le sue componenti, come l'adiposità viscerale, l'iperinsulinemia e l'insulino-resistenza, l'ipertrigliceridemia e i bassi livelli di colesterolo HDL) (82-84). In tempi più recenti, diversi studi hanno mostrato l'esistenza di una relazione fra PCR e rischio di DM2. Nel *Women's Health Study* (85), ad esempio, il rischio relativo di comparsa di DM2 nelle donne del quartile più alto dei marker infiammatori, rispetto al più basso, risultava 15.7 (95% IC: 6.5-37.9) per la PCR e 7.5 (95% IC: 3.7-15.4) per l'IL-6. L'associazione positiva permaneva anche dopo aggiustamento per BMI, familiarità per DM2, fumo, attività fisica, consumo di alcool e terapia ormonale sostitutiva. Dati analoghi si riscontrano nel *West of Scotland Coronary Prevention Study* (WESCOPS) in cui gli uomini caratterizzati dai più alti livelli di PCR (IV quartile: PCR >4.18 mg/l) presentavano un rischio di DM2 tre volte più alto rispetto a coloro che avevano i livelli più bassi (I quartile: PCR <0.66 mg/l); la significatività statistica si manteneva anche dopo aggiustamento per i fattori di rischio comunemente impiegati nella pratica clinica, come BMI, trigliceridi e glicemia (86). Tali risultati sono stati confermati da un successivo studio finlandese che rilevava, dopo un *follow-up* di 11 anni, che i soggetti con valori di PCR ≥ 3 mg/l presentavano un rischio maggiore di sviluppare DM2 (OR 4.1; 95% IC: 2.1-8.0) rispetto ai soggetti con livelli di PCR ≤ 1 mg/l; questa relazione persisteva anche dopo correzione per stile di vita e sensibilità insulinica (OR 2.3, 95% IC: 1.0-1.5) (87). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche nella popolazione giapponese (88). Il *Nurses Health Study* ha dimostrato che anche altri marcatori dell'infiammazione sono importanti fattori predittivi indipendenti dello sviluppo di DM2; infatti il rischio relativo di sviluppare la malattia, dopo aggiustamento per globuli bianchi, PCR, insulinemia o HbA1c, risultava 5.43 (95% IC: 3.47-8.5) per E-selectina, 3.56 (95% IC: 2.28-5.58) per ICAM-1, 1.12 (95% IC: 0.76-1.66) per VCAM-1 (89). Nell'*Insulin Resistance Atherosclerosis Study* (90), i livelli basali di fibrinogeno, PCR e *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) risultavano più elevati nei soggetti che sviluppavano DM2 nei 5 anni di *follow-up*. L'incidenza di DM2 aumentava in modo lineare e significativo con l'incremento dei livelli di PCR e PAI-1 (Fig. 8).

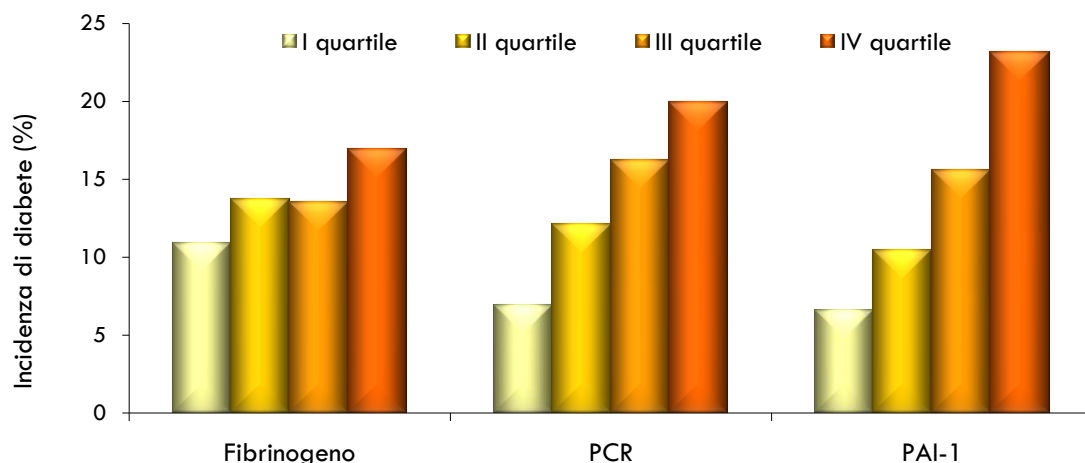


Figura 8. Incidenza di diabete tipo 2, stratificata per quartili di proteine infiammatorie, nell'*Insulin Resistance Atherosclerosis Study*. Valore di p per fibrinogeno 0.06; p per PCR e PAI-1 0.001.

L'associazione risultava valida sia negli uomini che nelle donne, sia nei soggetti magri che in quelli obesi, indipendentemente dalla razza. Tuttavia, l'associazione fra sviluppo di DM2 e marcatori dell'infiammazione, risultava in questo ed in altri studi (91), notevolmente attenuata quando i dati venivano corretti per BMI e insulino-resistenza, suggerendo che il grasso corporeo e l'insulino-resistenza spiegavano in parte tale relazione. Al contrario, l'associazione fra PAI-1 e incidenza di DM2 risultava particolarmente stretta ed indipendente da altri fattori di rischio noti, come età, BMI, familiarità, attività fisica. Questo potrebbe indicare che il PAI-1, seppur notoriamente correlato all'insulino-resistenza e all'adiposità viscerale (92-93), potrebbe essere un *marker* molto precoce di insulino-resistenza e di conseguenza di DM2. Infatti, in una popolazione ad alto rischio di DM2 come quella del *Framingham Offspring Study*, i livelli di PAI-1 risultavano correlati alle concentrazioni di insulina sia nei soggetti con normale tolleranza glucidica che in quelli con alterata tolleranza (94), suggerendo che le alterazioni fibrinolitiche comunemente osservate in questi stati metabolici siano legate all'insulino-resistenza.

Recentemente, è stato valutato il ruolo di un altro fattore prodotto dal tessuto adiposo, l'adiponectina, nella modulazione del processo infiammatorio e della sensibilità insulinica. Questa proteina, che svolge attività anti-infiammatoria e insulino-sensibilizzante (95), risulta ridotta nei soggetti obesi e nei pazienti diabetici (96). In una popolazione ad alto rischio, gli Indiani Pima, è stato evidenziato che la riduzione dei livelli di adiponectina costituiva, dopo 4-6 anni di *follow-up*, un fattore di rischio indipendente per la progressione a DM2, anche dopo correzione per i fattori di rischio tradizionali (97). Risultati analoghi sono stati successivamente confermati da altri studi, in

differenti etnie (98-102). Lo studio ARIC, ad esempio, ha dimostrato che i soggetti con livelli di adiponectina nel più alto quartile presentano una riduzione del 40% del rischio di sviluppare DM2 rispetto ai soggetti nel quartile più basso. Questa associazione protettiva era simile negli uomini e nelle donne, negli africani-americani come nei bianchi e nelle differenti categorie di BMI. Una simile percentuale di riduzione del rischio di DM2 per i soggetti con livelli di adiponectina nel più alto terzile (HR 0.44; 95% IC: 0.28-0.70; p-trend 0.0007) è stata evidenziata, dopo 18 anni di *follow-up*, anche da un ampio studio tedesco (103).

Tali osservazioni epidemiologiche potrebbero avere una giustificazione fisiopatologica se si considera che alcune citochine, contribuendo all'istaurarsi di un processo infiammatorio di basso grado, possono promuovere, mediante numerosi meccanismi, l'insulino-resistenza, e quindi favorire lo sviluppo di DM2. Ad esempio, l'IL-6, una citochina pro-infiammatoria prodotta sia dal tessuto adiposo, che da cellule endoteliali, macrofagi e linfociti, potrebbe interferire con il segnale insulinico mediante l'induzione di proteine che si legano con il recettore dell'insulina (104). L'IL-6 inibisce anche l'attività della lipoprotein-lipasi con aumento della concentrazione di acidi grassi liberi (FFA = *Free Fatty Acids*) e quindi dell'insulino-resistenza (105). Inoltre, l'IL-6 stimola la secrezione delle maggiori citochine infiammatorie come l'IL-1 e il *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α). Quest'ultimo, a sua volta, riduce l'*up-take* di glucosio insulino-mediato e promuove la disfunzione endoteliale (106).

- Alterata funzionalità epatica. Recenti osservazioni suggeriscono che l'epatosteatosi non alcolica (NASH = Non-Alcoholic Steatohepatitis), caratterizzata da alterazione della funzionalità epatica legata a insulino-resistenza, può rappresentare un *marker* ed essere coinvolta nello sviluppo del DM2 (107). Il fegato, infatti, gioca un ruolo centrale nel metabolismo glucidico e nella clearance dell'insulina (108). La NASH si caratterizza per l'elevazione dei livelli circolanti di aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e γ -glutamyl-transferasi (γ -GT) (109). Tradizionalmente, elevati livelli di enzimi epatici sono stati interpretati come *marker* di abuso d'alcool o di danno epatico (110). Studi osservazionali, hanno evidenziato che elevati livelli di ALT risultano associati con la presenza di epatosteatosi e insulino-resistenza, alterazioni che predispongono allo sviluppo di DM2 (111-112). Infatti, nell'*Insulin Resistance Atherosclerosis Study*, in un'analisi aggiustata per età, sesso, etnia e consumo di alcool, i partecipanti con AST (OR 1.73; 95% IC: 1.17-2.57) e ALT (OR 2.32; 95% IC: 1.36-

3.75) nel quartile più alto presentavano rischio maggiore di sviluppare DM2 rispetto ai soggetti con valori di enzimi epatici nei quartili più bassi (113). Nello studio CARDIA (114) i soggetti nel più alto quartile di AST presentavano un rischio di DM2 significativamente più elevato. Sia ALT che AST risultavano indipendentemente associate alla comparsa di diabete in un gruppo di uomini Coreani (115). Infine, dati elaborati dallo studio WOSCOP (116) hanno mostrato che i soggetti con livelli di ALT nel quartile più alto (≥ 29 U/L) presentavano un rischio più alto di sviluppare DM2 (HR 3.38; 95% IC: 1.99-5.73), indipendentemente da altri fattori di rischio.

Recentemente, è stato evidenziato che anche γ -GT è correlata con i fattori di rischio cardiovascolare (117), la SM (118), l'insulino-resistenza (119) e il DM2 (120-123) ed è stato proposto come *marker* di stress ossidativo (124). γ -GT partecipa al mantenimento delle difese intracellulari attraverso la mediazione del trasporto extracellulare di glutathione (125). Un'aumentata attività di γ -GT in risposta allo stress ossidativo servirebbe a facilitare il trasporto di glutathione nelle cellule (Fig. 9).

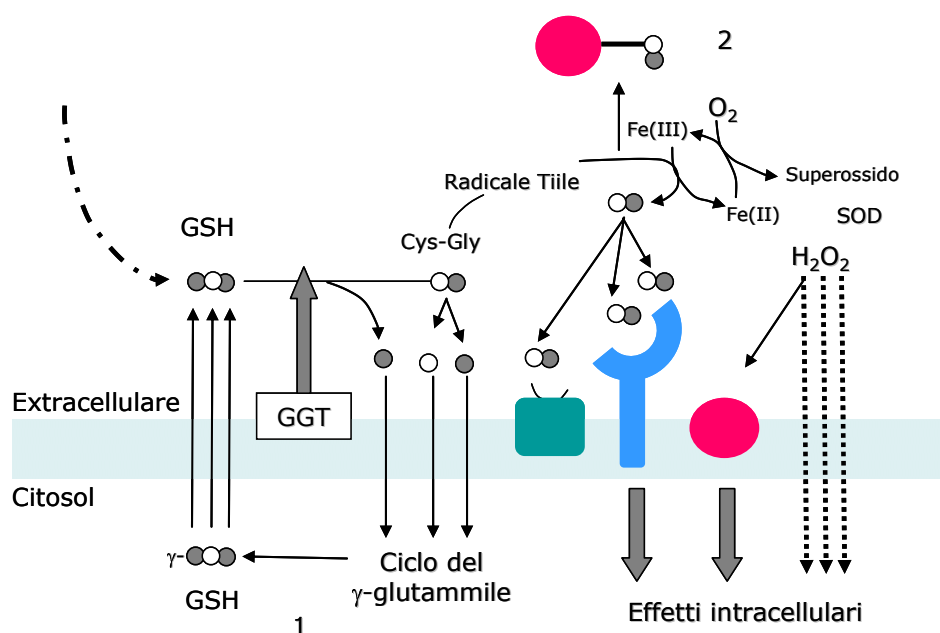


Figura 9. Catabolismo GGT-dipendente del glutathione (GSH) extracellulare: 1- recupero degli aminoacidi precursori per la sintesi del GSH intracellulare; 2- potenziali reazioni pro-ossidanti nell'ambiente extracellulare.

Nel *British Regional Heart Study*, è stata osservata una forte associazione indipendente fra livelli di γ -GT e incidenza di DM2 nei 13 anni di *follow-up*. Tale associazione si osservava nel range di normalità di valori di γ -GT e risultava indipendente da BMI e

consumo di alcool. Nel *Mexico City Diabetes Study* (126), livelli più elevati di γ -GT (IV vs. I quartile) risultavano predittori sia di IGT che di DM2 (OR 1.62; 95% IC:1.08-2.42), dopo correzione per fattori confondenti. Negli studi prospettici è solitamente stato valutato il valore predittivo dei livelli basali di γ -GT nei confronti del futuro sviluppo di DM2, ma recentemente è stato evidenziato che anche un incremento nel tempo dei livelli di tale enzima, pur sempre nel *range* di normalità, è correlato con un aumentato rischio di incidenza di DM2, indipendentemente dai valori basali di γ -GT (127).

Basi genetiche del diabete tipo 2

L'identificazione e caratterizzazione delle varianti genetiche che causano o predispongono al DM è uno dei maggiori obiettivi della ricerca biomedica. Sono state inizialmente comprese le basi molecolari di molte forme monogeniche di DM e di DM neonatale. Queste tipologie di DM, sebbene relativamente infrequenti (cumulativamente rendono conto di circa il 5% dei casi di DM; Fig. 10), hanno contribuito alla scoperta di geni candidati e fornito intuizioni preziose sui meccanismi che regolano l'omeostasi del glucosio. Rispetto ai progressi raggiunti nell'identificazione dei geni che causano il DM monogenico, la ricerca delle varianti di suscettibilità per il DM2 procede lentamente, sia perché lo sviluppo del DM2 dipende da numerosi geni i cui effetti sono deboli, sia perché la scelta dei geni da studiare è resa difficoltosa dall'incompleta conoscenza dell'eziopatogenesi del DM2.

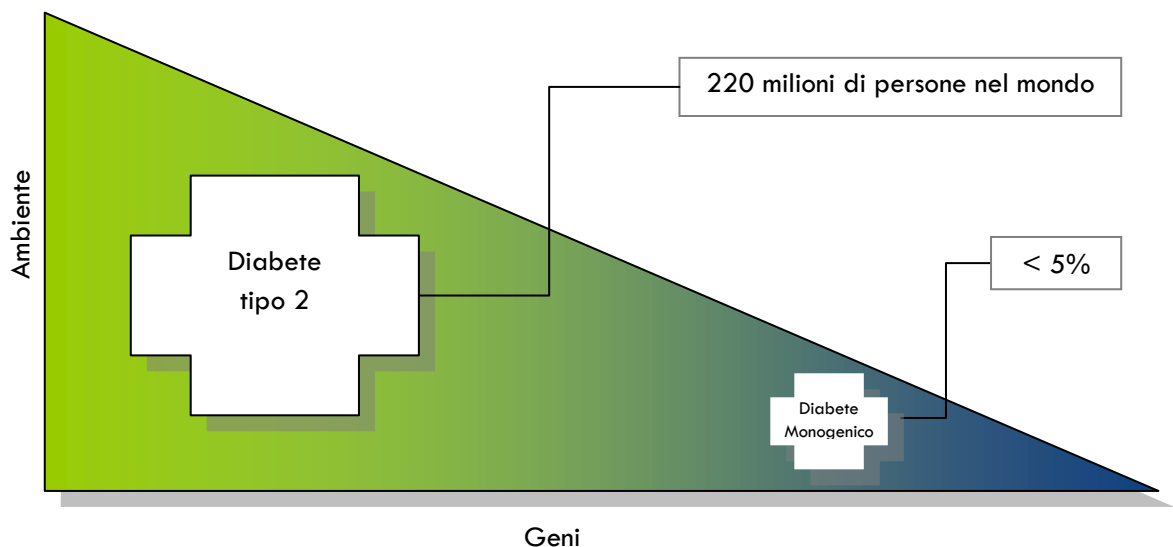


Figura 10. Prevalenza del diabete in relazione all'ambiente e al genotipo.

Gli approcci allo studio genetico del DM sono stati molteplici, partendo dall'analisi di regioni genetiche nell'ambito di famiglie ad alta prevalenza di DM (studi di *linkage*), passando poi allo studio di geni candidati in relazione alla loro funzione biologica, fino ai più moderni ed ampi studi di associazione su tutto il genoma (GWAS).

Gli studi di *linkage* familiare consistono in analisi di regioni genomiche condivise da familiari con tassi di frequenza più alti di quanto atteso e sono attuati utilizzando *markers* di polimorfismo come i micro satelliti o le ripetizioni in tandem. Questo tipo d'indagine consente di determinare la posizione cromosomica di un locus, responsabile di una malattia o di un carattere genetico, rispetto a dei marcatori polimorfici, di cui è nota la posizione. Si tratta di un approccio che si è rivelato di successo nell'identificare varianti genetiche rare, responsabili di disordini monogenici (a trasmissione mendeliana) come il MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) (128).

Negli studi sui geni candidati si tenta di correlare variazioni biologiche (il fenotipo) e variazioni nelle sequenze del DNA (il genotipo) nella forma del polimorfismo di un singolo nucleotide, cioè il cambiamento di una singola base nella sequenza del genoma umano. Queste varianti, localizzate su introni o esoni del gene, potrebbero causare un'alterazione dell'espressione e/o della funzione del prodotto genico che, a sua volta, potrebbe compromettere una funzione biologica o causare una malattia. I geni candidati, nel caso del DM2, sono, per esempio, geni che codificano per proteine che partecipano al segnale dell'insulina all'interno della cellula e geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo del glucosio o nella regolazione della secrezione insulinica da parte della β -cellula pancreatica. Le varianti candidate sono state scoperte attraverso lavori di sequenziamento, che sono stati agevolati dal parallelo progresso del Progetto Genoma Umano (129) e dalla disponibilità dei polimorfismi di un singolo nucleotide in database pubblici (130). Alcuni dei risultati ottenuti con questo approccio hanno mantenuto la loro validità nel tempo, come nel caso della variante P12A nel gene del recettore attivato dal proliferatore dei perossisomi γ (PPAR- γ) (131-133), la variante E23K nel gene KNCJ11 (134), le frequenti varianti dei geni del fattore di trascrizione 2 epatico (TCF2, ora noto come HNF1B) (135-136) e del gene della sindrome di Wolfram 1 (WFS1) (137). Tutti questi geni codificano per proteine che hanno legami biologici forti con il DM e giocano un ruolo eziologico per le forme sia monogeniche sia multifattoriali di DM (Fig. 11).

Un esempio deriva dalle mutazioni del gene PPAR- γ : una rara mutazione di questo gene conduce ad una sindrome da insulino-resistenza (137), mentre un polimorfismo di un singolo nucleotide si associa ad aumento del rischio di DM2. Mutazioni rare del gene HNF1A causano MODY-3 ed una variante comune ha effetto sul rischio di DM negli indiani Oji-Cree (138); varianti frequenti del promoter P2 del gene HNF4A, responsabile anche del MODY-1, sono implicate nel rischio di DM2 (139); rare mutazioni di GCK causano DM

neonatale permanente (PNDM = Permanent Neonatal Diabetes Mellitus) e MODY 2 (140) e una variante comune di un promoter altera la glicemia a digiuno negli adulti (141). Varianti comuni nel gene LMNA hanno effetto sul rischio di DM2 e SM (142). D'altra parte, non ci sono prove che mutazioni rare nel TCF7L2, il più importante gene di suscettibilità per il DM2 ad oggi individuato, possano causare forme di DM monogenico (143).

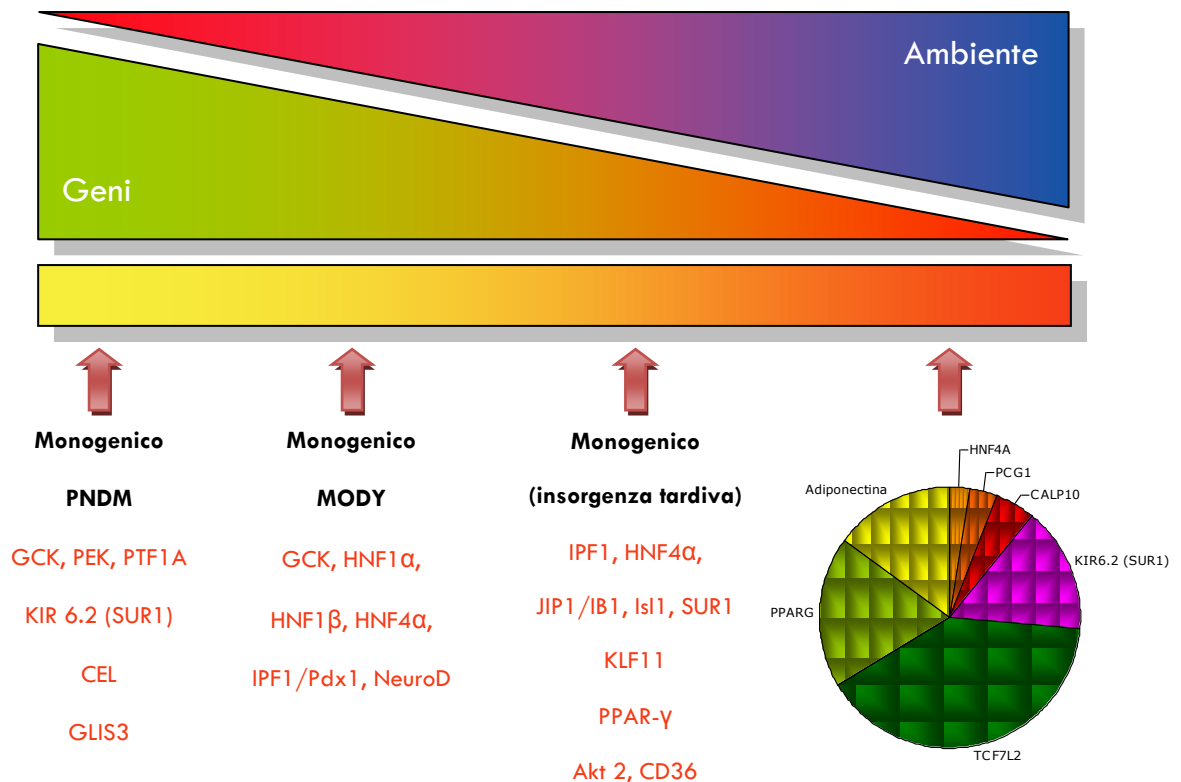


Figura 11. Effetti dei geni e dell'ambiente sui diversi tipi di diabete.

Di seguito una breve discussione sui principali geni candidati per il DM2.

- PPAR- γ . Il gene PPAR- γ , posto sul braccio corto del cromosoma 3, codifica per il recettore attivatore del proliferatore dei perossisomi γ -2, un recettore nucleare presente in molti tessuti, ma espresso prevalentemente negli adipociti, dove regola la trascrizione di geni coinvolti nell'adipogenesi. Questa proteina è il bersaglio molecolare dei tiazolidinedioni (glitazoni), farmaci ipoglicemizzanti orali utilizzati nella terapia del DM2 e, per questo, è un gene candidato interessante. Una variante di questo gene è caratterizzata dalla presenza di un residuo di prolina (Pro), in posizione 12, al posto

dell'alanina (Ala) (Pro12Ala) (144). Questa variazione è un esempio di polimorfismo di un singolo nucleotide di tipo *missense*, in cui il cambiamento di una singola base altera la sequenza aminoacidica e, presumibilmente, anche la funzione della proteina. È stato dimostrato che i soggetti omozigoti per l'allele Pro, quando adottano uno stile di vita occidentale, tendono ad avere un peso corporeo superiore a quelli con l'allele Ala (145). Gli individui omozigoti per il più frequente allele Pro hanno un maggior grado di insulino-resistenza (146) e circa il 20% ha una maggiore probabilità di sviluppare DM2 (147) rispetto ai soggetti portatori dell'allele Ala. La riduzione di rischio individuale conferita dall'allele Ala è moderata, circa il 15%, ma poiché l'allele di rischio Pro è molto frequente, esso si traduce in un rischio attribuibile alla popolazione (PAR) pari al 25% (131). Il PAR esprime la frazione di malattia che potrebbe essere eliminata dalla popolazione se la variante di rischio non esistesse.

- KCNJ11 – KCNQ1. Un altro bersaglio di farmaci impiegati in pazienti con diabete tipo 2 è il recettore della sulfonilurea SUR1. Il gene codificante per tale recettore, ABCC8, si trova poche kilobasi a monte del gene KCNJ11, che codifica per il suo partner funzionale, il canale del potassio ATP-sensibile Kir6.2. Insieme, formano una proteina ottamerica che regola il potenziale trans membrana e, in tal modo, la secrezione dell'insulina stimolata dal glucosio, nella β -cellula pancreatica. La chiusura del canale del potassio è un prerequisito perché si possa avere la secrezione di insulina. Un polimorfismo *missense* in KCNJ11 (per cui il glutammato è scambiato con la lisina nel codone 23, E23K) è stato associato con il DM2 in uno studio di meta-analisi (148); questo risultato è poi stato confermato in un successivo studio di associazione su larga scala (134). L'allele di rischio è associato anche con una modesta alterazione della secrezione di insulina (132-133). Inoltre, una mutazione attivante il gene causa una grave forma di DM neonatale (149). Anche un altro canale del potassio, codificato dal gene KCNQ1, è stato recentemente implicato nel DM2 mediante studi di associazione su tutto il genoma (150-151).
- ENPP1. Un altro gene candidato, ampiamente studiato, è ENPP1, codificante per la fosfodiesterasi alcalina/pirofosfatasi nucleotidasica, un inibitore del segnale dell'insulina. L'allele Q (glutamina) nella variante *missense* K121Q è stato nominalmente associato con DM2, obesità e insulino-resistenza in piccole coorti (152). Controversi sono i risultati di studi successivi più ampi, alcuni hanno confermato un'associazione positiva con il DM2 (153-154), mentre altri studi non hanno replicato

questo risultato (155-156). Tuttavia, in una recente meta-analisi di circa 42000 casi, è stata documentata un'associazione di questa variante con il DM2 in popolazioni europee secondo un modello recessivo (OR 1.38; 95% IC: 1.10-1.74) (157).

- WSF1. Il gene WFS1 può essere considerato un gene candidato per il DM2. In effetti, recentemente, sono stati studiati 1536 SNP di 84 geni candidati per valutare l'eventuale associazione con il DM2 (Sandhu MS, 2007) e da quest'analisi sono emersi solamente due SNP del gene WFS1 ($P \sim 10^{-7}$, $OR \sim 1.11$). Il risultato è stato riprodotto in 9533 casi e 11398 controlli ed è stato replicato in coorti indipendenti (158). Sembra che le varianti di rischio abbiano effetto sulle funzioni della β -cellula (159-160).
- CAPN10. Il gene CAPN10, codificante per la calpaina 10, una proteasi con implicazione nel metabolismo del glucosio (161). Gli SNP intronici 43, 44 e 63, sembrano associati con un aumento del rischio di DM2 (162-165). L'allele G (glicina) del polimorfismo 43 è associato con una ridotta espressione del gene nel muscolo scheletrico e con insulino-resistenza (166). Come questo si traduca in un incrementato rischio di DM2 non è noto e saranno necessari ulteriori studi funzionali. CAPN10 non è stato confermato come gene candidato per il diabete mellito tipo 2 negli studi di associazione su tutto il genoma.

Negli ultimi anni sono stati realizzati enormi progressi nelle conoscenze relative alla genetica del DM2. In primo luogo il completamento del Progetto Genoma Umano ha consentito di individuare milioni di SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) e depositarli in database pubblici; è stato così possibile studiare quale fosse lo specifico contributo di queste varianti frequenti nei confronti della componente genetica di una malattia (167). In secondo luogo, l'*International HapMap Project* (HapMap) ha genotipizzato quasi quattro milioni di SNP in 270 campioni di DNA e identificato i cosiddetti tag-SNP cioè, polimorfismi di un singolo nucleotide correlati (in *linkage disequilibrium*) con varianti frequenti e che quindi possono essere considerati come *proxies* per tali varianti (sebbene la regione di DNA che le contiene non sia stata analizzata direttamente) (168). Più semplicemente, sono stati individuati degli aplotipi, intesi come *subsets* di *markers*. In terzo luogo, sono divenute disponibili tecnologie di genotipizzazione *high-throughput* che consentono l'esecuzione di studi di associazione su tutto il genoma (GWAS) con tempi ed a costi significativamente minori rispetto al passato. Sono, inoltre, ora disponibili strumenti analitici che consentono di interpretare queste grandi serie di dati (169-170). Infine, attraverso collaborazioni internazionali, sono state messe insieme e condivise grandi raccolte di casi con fenotipi ben

caratterizzati. Un'altra acquisizione che ha contribuito ai progressi fatti finora è quella relativa all'importante ruolo del DNA non codificante proteine (come mostrato, ad esempio, in regioni non codificanti conservatesi nel corso dell'evoluzione o dai microRNA) (171-172) che ha posto al centro dell'attenzione tutto il genoma e non più i singoli geni o, in particolare, le sole regioni codificanti.

Grazie a questi progressi, nel 2007 è stato registrato un enorme passo avanti nella conoscenza della genetica del DM2 (Tab. 4). Sono stati pubblicati parecchi studi di associazione sull'intero genoma che hanno utilizzato frammenti di DNA con più di 500.000 SNP in un grande numero di pazienti con DM2 e controlli. Infatti, i cinque principali GWAS per il DM2 hanno coinvolto, approssimativamente, 55.000 individui (173-177). Questi studi hanno molte caratteristiche in comune. In primo luogo, come detto, tutti hanno usato campioni di dimensioni relativamente grandi con un numero di casi oscillante tra 686 e 1924 e un numero di controlli da 669 a 5275 in ciascuno studio. In secondo luogo, tutti gli studi hanno usato campioni di DNA che erano stati raccolti da una ben definita area del nord Europa e tutti i partecipanti erano di discendenza nord europea. Questo ha ridotto il probabile impatto della mescolanza di popolazioni, uno dei pochi possibili fattori confondenti che può presentarsi in studi di associazione genetica e che consiste in un processo che porta ad un pool genico composito in cui, almeno alcuni individui, 'derivano' da più di una popolazione. In terzo luogo, tutti e cinque a disposizione studi di *follow-up* caso-controllo e hanno incluso uno stadio di replicazione, dove è stata testata la solidità statistica delle associazioni identificate. Un'associazione, per essere considerata statisticamente significativa, in questi studi richiede valori p inferiori a 5×10^{-8} .

In tutti i casi, i ricercatori hanno sottolineato che le loro scoperte identificano solidi 'segnali' di associazione o 'regioni geniche' piuttosto che veri e propri geni. Questo per due ragioni. In primo luogo, la correlazione tra varianti genetiche frequenti (il *linkage disequilibrium*) non significa che l'associazione trovata consista nella variante o nella combinazione di varianti con ruolo causale. Per esempio, nella regione HHEX (*Haematopoietically Expressed Homeobox*)- IDE (*Insulin Degrading Enzyme*), un forte *linkage disequilibrium* si estende su tre geni, due dei quali sono verosimili candidati per il DM2. In secondo luogo, le varianti funzionali possono non trovarsi in prossimità delle porzioni codificanti di un gene, potrebbero piuttosto influenzare un elemento regolatore che potrebbe non essere stato ancora caratterizzato.

Tabella 4. Varianti genetiche associate con il diabete tipo 2 individuate dagli studi di scansione *genome-wide* ordinati per cromosoma (Cr).

| Marker | Cr. | Descrizione | Regione del gene | Funzione | Allele di rischio | Odds Ratio | p |
|------------|-----|--------------------------------|------------------|--|-------------------|------------|-----------------------|
| rs10923931 | 1 | Intronico | NOTCH2 | Recettore transmembrana implicato nell'organogenesi pancreaticata | T | 1.13 | 4.1x10 ⁻⁸ |
| rs7578597 | 2 | Missense: T1187A | THADA | Adenoma tiroideo; associato con PPARγ | T | 1.15 | 1.1x10 ⁻⁹ |
| rs4607103 | 3 | 38 kb a monte | ADAMTS9 | Metallo proteinasi di secrezione espressa in muscolo e pancreas | C | 1.09 | 1.2x10 ⁻⁸ |
| rs4402960 | 3 | Intronico | IGF2BP2 | Proteina legante fattore di crescita, sviluppo pancreatico | T | 1.14 | 8.9x10 ⁻¹⁶ |
| rs1801282 | 3 | Missense: P12A | PPARG | Fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo dell'adipocita | C | 1.19 | 1.5x10 ⁻⁷ |
| rs10010131 | 4 | Giunzione tra introne ed esone | WFS1 | Proteina transmembrana del reticolo endoplasmatico | G | 1.15 | 4.5x10 ⁻⁵ |
| rs7754840 | 6 | Intronico | CDKAL1 | Omologo di CDK5RAP1, inibitore di CDK5; sensore di glucotossicità insulare | C | 1.12 | 4.1x10 ⁻¹¹ |
| rs864745 | 7 | Intronico | JAZF1 | Repressore di trascrizione; associato con il cancro della prostata | T | 1.10 | 5.0x10 ⁻¹⁴ |
| rs13266634 | 8 | Missense: R325W | SLC30A8 | Trasportatore dello zinco della β-cellula ZnT8; stoccaggio e secrezione insulinica | C | 1.12 | 5.3x10 ⁻⁸ |
| rs10811661 | 9 | 125 kb a monte | CDKN2A/B | Inibitore di chinasi ciclina-dipendenti e soppressore tumorale di p15; sviluppo insulare | T | 1.20 | 7.8x10 ⁻¹⁵ |
| rs12779790 | 10 | Regione intergenica | CDC123-CAMK1D | Ciclo cellulare/ proteina chinasi | G | 1.11 | 1.2x10 ⁻¹⁰ |
| rs7903146 | 10 | Intronico | TCF7L2 | Fattore di trascrizione; trasattiva i geni di insulina e proglucagone | T | 1.37 | 1.0x10 ⁻⁴⁸ |
| rs1111875 | 10 | 7.7 kb a valle | HHEX | Fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo pancreatico | C | 1.13 | 5.7x10 ⁻¹⁰ |
| rs5219 | 11 | Missense: E23K | KCNJ11 | Canale del potassio Kir 6.2; l'allele di rischio altera la secrezione di insulina | T | 1.14 | 6.7x10 ⁻¹¹ |
| rs7961581 | 12 | Intronico | TSPAN8-LGR5 | Glicoproteina della superficie cellulare implicata nel cancro gastrointestinale | C | 1.09 | 1.1x10 ⁻⁹ |
| rs8050136 | 16 | Intronico | FTO | Altera BMI nella popolazione generale | A | 1.17 | 1x10 ⁻¹² |
| rs757210 | 17 | Intronico | HNF1B | Fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo pancreatico | A | 1.12 | 5x10 ⁻⁶ |

Nel primo GWAS per il DM2 è stato inizialmente usato un campione di dimensioni modeste formato da pazienti Francesi affetti da DM2, con almeno un parente di primo grado affetto, giovane età d'esordio ed un indice di massa corporea inferiore a 30 Kg/m². Le più importanti scoperte di questo primo *scan* sono state poi replicate in 5511 ulteriori individui. Questo GWAS (come gli altri che sono seguiti) ha replicato l'associazione del gene TCF7L2 con il DM2 (173); inoltre ha rivelato che anche un polimorfismo di un singolo nucleotide *missense* nel gene SLC30A8 (OR 1.26, $p < 10^{-6}$) e una variante frequente in HHEX (OR 1.21, $p < 10^{-5}$) sono associati con il DM2. Il gene SLC30A8 codifica per un trasportatore dello zinco presente nei granuli contenenti insulina delle β -cellule (178); quest'acquisizione ha fornito una prova della validità dell'approccio seguito. HHEX invece codifica un fattore di trascrizione coinvolto nelle fasi iniziali dello sviluppo del pancreas (179). Altri due loci, EXT2-ALX4 e LOC387761, individuati in questo studio non hanno invece trovato conferma nei quattro successivi GWAS.

Il *Diabetes Genetic Initiative* (DGI), uno studio collaborativo condotto da Broad Institute, Lund University e Novartis Institute, ha analizzato, tramite GWAS, il DNA di 1464 pazienti con DM2 e 1467 controlli non diabetici di Finlandia e Svezia. I risultati ottenuti sono stati replicati in 10850 casi e controlli e poi condivisi con i ricercatori del gruppo FUSION (*Finnish USA Study of NIDDM*) e del gruppo WTCCC (*Wellcome Trust Case Control Consortium*) prima della pubblicazione, tenendo conto solo di quelli positivi, cioè osservati e riprodotti in tutti e tre gli studi, basati sul DNA di circa 32000 individui (174-176). Questi tre GWAS hanno confermato i risultati per i loci TCF7L2 ($p = 10^{-50}$, valore congiunto per le tre scansioni), KCNJ11 e PPAR- γ così come le nuove scoperte di HHEX e SLC30A8, ed hanno anche identificato CDKAL1 (OR 1.12, $p < 10^{-10}$), IGF2BP2 (OR 1.14, $p < 10^{-15}$) e CDKN2A/B (OR 1.20, $p < 10^{-14}$) come nuovi loci di suscettibilità per il DM2.

Contemporaneamente, i ricercatori DeCode e i loro collaboratori, genotipizzando 6674 casi di DM2 e controlli Islandesi, hanno confermato l'associazione di HHEX e SLC30A8; studi di replicazione in campioni di cinque diverse popolazioni (Danimarca, Filadelfia, Olanda, Hong Kong e Africa occidentale) hanno rilevato, in modo indipendente, il segnale CDKAL1 (177).

In parallelo, le varianti nel gene FTO sono state associate con l'obesità patologica, e sarebbero, quindi, in grado di contribuire al DM2 (180-181). Il gene è espresso a livello ipotalamico, la sede del centro dell'appetito. La regione genica FTO emerge da un unico

studio in cui essa è associata con il BMI, necessita, pertanto, di conferma in studi caso/controllo con BMI simili.

Altri GWAS sono stati simultaneamente condotti a bassa densità e/o in campioni più piccoli (182-186); i risultati ottenuti da questi studi richiedono repliche in coorti addizionali prima di raggiungere adeguati livelli di evidenza statistica.

È interessante sottolineare che molte delle nuove varianti scoperte influenzano la secrezione insulinica piuttosto che l'insulino-resistenza, evidenziando così il ruolo cardine della disfunzione β -cellulare nella patogenesi del DM2. Tra questi geni ci sono TCF7L2, KCNJ11, HHEX, SLC30A8, CDKAL1, CDKN2A/2B, IGF2BP2, KCNQ1, WFS1. I loci appaiono associati con un incrementato rischio di sviluppare DM2 attraverso una riduzione della capacità secretoria dell'insulina. In particolare, i geni CDKN2A e CDKN2B codificano per gli inibitori della chinasi ciclina-dipendente 2A e 2B, cioè p15^{INK4b} e p16^{INK4b}, influenzando la capacità rigenerativa delle isole pancreatiche attraverso l'inibizione, rispettivamente, delle chinasi ciclina dipendenti 4 e 6 (CDK4 e CDK6) (187-191). Il gene IGF2BP2 si trova in vicinanza di un picco di linkage per il DM2 sul cromosoma 3q; il segnale di associazione si stende attraverso il *promoter* ed i primi due esoni di questo gene che codifica l'*Insulin-like growth factor 2 binding protein 2*. Questa proteina lega l'estremità 3' della regione non tradotta nell'mRNA del fattore di crescita insulino-simile 2 (IGF2) e, quindi, ne regola la traslazione al fine di consentirne la sintesi, importante per lo sviluppo del pancreas (192). IGF2 è coinvolto nella proliferazione cellulare, differenziazione e stimolazione dell'azione dell'insulina. Il gene CDKAL1 (*Cyclin-Dependent Kinase 5 regulatory subunit Associated protein 1-Like 1*) contiene un segnale di *linkage* al centro nel suo quinto introne, è altamente espresso nelle isole pancreatiche umane e nel muscolo scheletrico ed è omologo di CDK5RAP1, un inibitore della chinasi ciclina dipendente CDK5 che trasduce segnali di glucotossità nella β -cellula pancreatica. CDK5 si associa a ridotta funzione β -cellulare attraverso la formazione di un complesso con la proteina p53 che *down-regola* l'espressione di insulina (193-194). La variante di CDKAL1 associata alla suscettibilità per il DM2 conferirebbe un aumento del rischio attraverso la riduzione della secrezione insulinica (195). Nello specifico, è stato dimostrato che la risposta insulinica nei portatori di due copie dell'allele di rischio è più bassa del 22% rispetto agli eterozigoti o ai non portatori (196). SLC30A8 (famiglia di trasportatori di soluti 30, membro 8) codifica per un trasportatore dello zinco specifico della β -cellula che è coinvolto nella biosintesi di insulina ed ha effetto su stabilità, stoccaggio e secrezione dell'insulina. La variante di questo gene associata con il rischio di DM2 è caratterizzata dalla presenza di un residuo di triptofano al posto di uno di

arginina. Infine, la regione HHEX (*hematopoietically espressa homeobox*) si trova a poche megabasi di distanza dal gene TCF7L2, sul cromosoma 10q, ed ospita anche il gene IDE (*insulin degrading enzyme*); quest'ultimo codifica per l'enzima di degradazione dell'insulina che ha implicazioni sia per quanto riguarda il segnale dell'insulina che per la funzione delle isole pancreatiche. Sia HHEX, considerato un elemento critico per lo sviluppo del pancreas ventrale, che IDE sono importanti candidati biologici per il DM2. Il segnale sul cromosoma 10q per il DM2 si estende anche al gene KIF11, che codifica il *kinesin interacting factor*.

I dati ottenuti dai GWAS sul DM2 condotti dal gruppo FUSION (176), il WTCCC (175) e il DGI (174) sono stati poi combinati in una meta-analisi (197), seguita dalla replica in circa 50000 campioni indipendenti; questo progetto (chiamato DIAGRAM - *Diabetes Genetics Replication And Meta-analysis*; <http://www.well.ox.ac.uk/DIAGRAM/>) ha consentito di individuare nuovi loci associati con il DM2 con significatività statistica a livello di tutto il genoma.

TCF7L2: il gene maggiormente associato al diabete tipo 2

Finora l'associazione più forte con il DM2 è quella osservata nel 2006 per il gene TCF7L2 (198). Questa scoperta ha fatto seguito all'identificazione di una regione di linkage sul cromosoma 10q. I ricercatori hanno identificato parecchi SNPs associati con DM2 in una regione di forte linkage disequilibrium nel gene TCF7L2. Quest'associazione è stata replicata in quasi ogni popolazione esaminata (199-201), con un OR di quasi 1.4 per l'allele di rischio (sostanzialmente più alto di tutte le altre varianti geniche, per le quali l'OR oscilla tra 1.10 e 1.20). Studi prospettici hanno confermato l'impatto della variante di TCF7L2 sul rischio di DM2 e sulla progressione da IGT a DM2 (tasso di rischio di 1.55 tra gli omozigoti) (202-204).

TCF7L2 è uno dei primi geni di cui si è scoperta l'associazione con una malattia, in questo caso il DM2, senza che ci fosse una precedente conoscenza delle sue funzioni, perciò non 'nasce' come gene candidato, piuttosto dovrebbe essere considerato come un risultato inaspettato ottenuto attraverso analisi di *linkage* sul braccio lungo del cromosoma 10 (Fig. 12).



Figura 12. Gene TCF7L2 nella sua posizione genomica. Il prodotto del gene TCF7L2 è un *High Mobility Group* (HMG) box che contiene fattori di trascrizione implicati nell'omeostasi del glucosio ematico.

Il gene TCF7L2, conosciuto anche come TCF-4, codifica per un fattore di trascrizione che è espresso nel pancreas fetale ed è coinvolto nel segnale Wnt, un complesso *network* di proteine (Fig. 13), svolge una funzione critica nella proliferazione e nella motilità cellulare e nella normale embriogenesi, inoltre sembra regolare la miogenesi e l'adipogenesi (205-206). È fondamentale anche per lo sviluppo del pancreas e delle cellule insulari durante la crescita embrionale (207). TCF7L2 agisce come recettore nucleare per CTNNB1 (β -catenina) formando un eterodimero; ciò conduce ad una traslocazione nucleare che provoca, a sua volta, la trascrizione di alcuni geni, compreso il pro-glucagone intestinale (208). Nonostante l'incertezza riguardo alla variante causale, l'allele di rischio

del TCF7L2 condurrebbe ad alterata secrezione di insulina (209-210); ciò è compatibile con l'osservazione che l'associazione del TCF7L2 è più forte tra soggetti magri piuttosto che obesi con DM2.

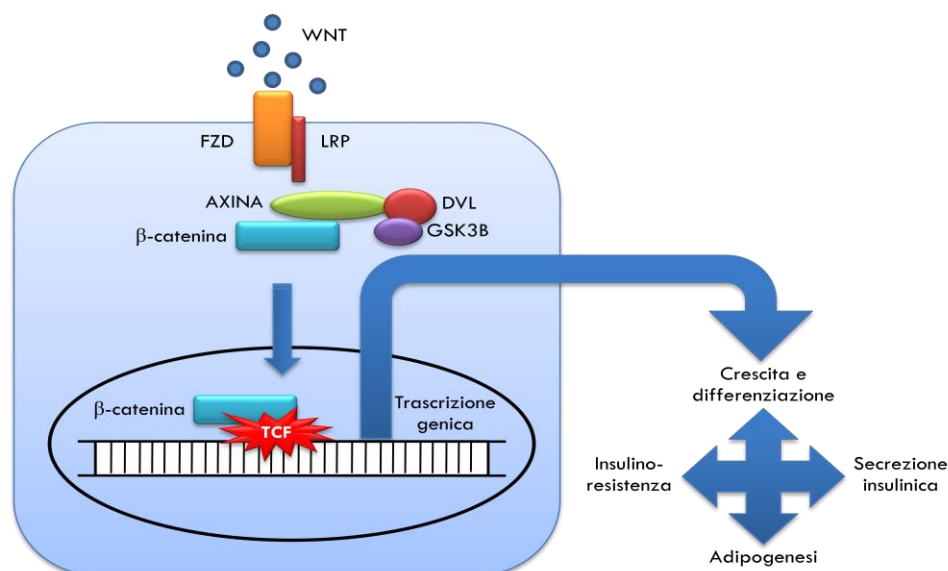


Figura 13. Rappresentazione schematica del signalling WNT/TCF. Le proteine Wnt secrete si legano ai recettori FZD e LRP, che, a loro volta, inattivano il complesso di degradazione che comprende Axina, DVL e GSK3B. Questo consente l'ingresso della β-catenina non fosforilata nel nucleo dove viene attivata la trascrizione genica. TCF7L2 potrebbe regolare l'espressione di parecchi geni e influenzare specificamente sia la secrezione che la sensibilità insulinica.

La principale fonte del segnale di associazione nella popolazione europea sembra essere un SNP intronico (rs7903146) che, almeno sul piano statistico, appare essere la variante con probabile significato causale (211). Lo SNP rs7903146 si trova in un introne (una regione non codificante del gene) senza un chiaro meccanismo in grado di influenzare l'attività di TCF7L2 (211). Poiché non ci sono polimorfismi codificanti correlati con rs7903146, è probabile che la variante causale agisca influenzando l'espressione di TCF7L2, piuttosto che alterando la struttura della proteina espressa. Florez et al (204) hanno mostrato che i portatori dell'allele di rischio T rs7903146 hanno livelli significativamente più bassi di secrezione insulinica rispetto agli omozigoti CC. Saxena et al (212) hanno evidenziato che individui omozigoti per l'allele di rischio rs7903146 hanno una riduzione di circa il 50% dell'indice insulinogenico e dell'*Insulin Disposition Index* che è il prodotto di due misure quantitative: funzione β-cellulare x insulino-sensibilità. Altri studi hanno condotto a risultati simili, con un effetto additivo, per ogni allele di rischio in più, per le misure di secrezione insulinica ma non per quelle di insulino-resistenza (213-215).

Il ruolo del TCF7L2 nella regolazione della secrezione insulinica trova conferma anche negli studi che hanno valutato l'associazione fra allele di rischio della variante rs7903146 e peso alla nascita (216). Ogni copia fetale dell'allele di rischio per il DM2 appare associata con un incremento del peso alla nascita di 18 g, mentre ogni copia materna è associata con un incremento del peso alla nascita del neonato pari a 30 g. L'associazione sussiste anche quando si effettua una stratificazione in base al genotipo fetale (31g), suggerendo che l'associazione è legata al genotipo materno, mentre l'associazione con il genotipo fetale potrebbe essere il risultato della forte correlazione tra genotipo di madre e feto. Inoltre sono stati analizzati *trait* correlati al diabete in 10314 individui non diabetici. Da queste analisi, è emerso che l'allele di rischio avrebbe effetto sul peso alla nascita, a causa di una riduzione della secrezione insulinica materna. Questo provocherebbe iperglicemia materna durante la gravidanza e quindi incremento di peso del neonato alla nascita.

Non è ancora chiaro attraverso quali meccanismi la versione difettosa del TCF7L2 altererebbe la secrezione insulinica. È stato suggerito che, nei portatori dell'allele di rischio, possa essere presente una riduzione della secrezione del peptide glucagone-simile 1 (GLP-1, la cui trascrizione è regolata da TCF7L2) da parte delle cellule entero-endocrine (198). Quindi ci sarebbe un diminuito effetto delle incretine (GLP-1 ma anche GIP), in grado di stimolare la secrezione di insulina dopo il pasto (217). In aggiunta o in alternativa a questo meccanismo potrebbero esserci difetti nel processamento dell'insulina (218). Infatti, uno dei bersagli di TCF7L2 è il gene HHEX, che si trova in una regione genica che comprende anche i geni KIF11 (per il *Kinesin-Interacting Factor*) e IDE (*Insulin Degrading Enzyme*). Alternativamente, poiché TCF7L2 è parte del WTN signaling, si ipotizza un effetto sulla massa β -cellulare, sullo sviluppo della β -cellula pancreatica e/o sulla funzione β -cellulare. È anche possibile che il gene sia coinvolto nella proliferazione delle β -cellule in risposta ad aumentate richieste di insulina. Nei soggetti all'esordio del diabete l'espressione del TCF7L2 nelle isole di Langerhans è aumentata di 5 volte ed è tanto più alta quante più copie ci sono dell'allele di rischio. Ciò rifletterebbe un difetto di trascrizione o traslazione del TCF7L2 stesso dal momento che, la sua sovra-espressione nelle isole umane si traduce in un'alterata secrezione di insulina. I dati sull'indice di massa corporea ed alcune associazioni preliminari con i livelli di leptina e grelina (211), comunque, non escludono un meccanismo centrale. Tale incertezza evidenzia quanto sia affascinante quest'approccio inverso che fornisce l'opportunità di scoprire nuovi meccanismi cellulari e fisiologici alla base di una patologia a partire dall'associazione di singoli SNP con la malattia.

Interazione geni-ambiente

Il DM2 è considerato una malattia poligenica dal momento che la suscettibilità individuale dipende da numerose varianti geniche o combinazioni di varianti (Fig. 14).

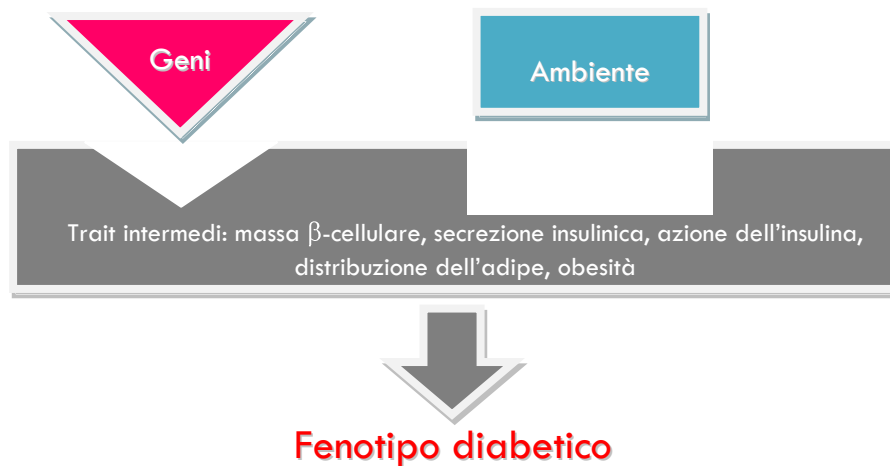


Figura 14. Interazione gene-ambiente e fenotipo del diabete.

Una malattia di questo tipo è, spesso, indicata anche come complessa, a causa del suo pattern di ereditarietà e, inoltre, la suscettibilità genetica al DM2 è un prerequisito necessario, ma non sufficiente, allo sviluppo della malattia che richiede la compartecipazione di fattori ambientali; i quali, a loro volta, dovrebbero essere considerati come elemento scatenante della malattia. A causa di queste interazioni tra fattori genetici e ambientali una malattia poligenica complessa può essere indicata anche come multifattoriale.

L'acquisizione di uno stile di vita occidentale gioca un ruolo chiave nell'incremento epidemico della prevalenza del DM2 nelle varie parti del mondo. Questo cambiamento si è verificato negli ultimi 50 anni. Chiaramente, durante questo periodo, si può ipotizzare una stabilità del *background* genetico, e quindi un ruolo importante dei geni nel rapido incremento di prevalenza della malattia, dal momento che i geni o le varianti di un gene possono controllare la risposta dell'individuo nei confronti di determinanti ambientali.

Per spiegare come si realizza l'interazione tra geni ed ambiente sono state proposte varie ipotesi, tra cui quella del gene risparmiatore. Neel (219) ha suggerito che gli individui che vivono in un ambiente con apporto di cibo incostante, come nomadi e cacciatori, avrebbero maggiori probabilità di sopravvivenza se avessero a disposizione maggiori riserve di energia. In tali ambienti, la selezione genetica favorirebbe i genotipi in grado di utilizzare substrati energetici in modo "economico", conservandone quantità maggiori, preservando il glucosio per le richieste del cervello in condizioni di mancanza di cibo; tutto ciò condurrebbe ad una propensione genetica verso una minor capacità di utilizzare glucosio, cioè verso l'insulino-resistenza dei tessuti periferici. Inoltre, il grasso, specialmente il grasso intra-addominale, è una forma di accumulo di energia più efficiente rispetto al glicogeno muscolare ed epatico. Questa tendenza si osserva nei fenotipi insulino-resistenti e spiega perché la prole di soggetti con DM2 abbia un accumulo più precoce di grasso centrale (220). Nel mondo occidentale, infatti, la disponibilità di cibo è abbondante e generale, per cui i cosiddetti geni 'risparmiatori' sono poco adattabili all'ambiente della società moderna e potrebbero contribuire alla suscettibilità per l'obesità e per il DM2. Comunque, queste teorie evoluzionistiche, che si concentrano su potenziali vantaggi per la sopravvivenza conferiti dai geni risparmiatori, divenuti nel tempo geni poco adattabili, sono di grande interesse, ma speculative e difficili da provare (221).

L'accumulo e il ridotto consumo di energia possono avvenire mediante diversi meccanismi: un metabolismo efficiente nel risparmiare energia; l'adipogenesi, cioè la propensione a un rapido aumento di peso; a seguito di una tendenza ad alimentarsi in modo eccessivo in presenza di larghe disponibilità di cibo e infine attraverso la tendenza a risparmiare energia attraverso l'inattività fisica (222). Il risparmio fisiologico probabilmente non è causa di obesità e/o DM2, perché la capacità di inibire processi non essenziali, in condizioni di assenza di cibo, non esprime chiaramente una condizione di mal-adattamento in caso di normale o eccessiva introduzione di alimenti. Le altre forme di risparmio potrebbero essere imputabili a geni che sostengono un mal adattamento nella società moderna. È stata proposta anche una spiegazione alternativa, la cosiddetta ipotesi del fenotipo risparmiatore che pone l'accento sulla programmazione intrauterina (Fig. 15; 223). Secondo questa ipotesi, la malnutrizione intrauterina condurrebbe a un basso peso alla nascita ed incrementerebbe il rischio di sindrome metabolica (aggregazione di diversi fattori di rischio cardiovascolare come obesità addominale, dislipidemia, ipertensione e intolleranza al glucosio) nella vita adulta. Quest'ipotesi è stata riprodotta in parecchi studi, nei quali è stato anche dimostrato che il rischio di basso peso alla nascita è aumentato nelle

famiglie con SM (224) suggerendo che un basso peso alla nascita possa essere la manifestazione fenotipica di un gene risparmiatore.

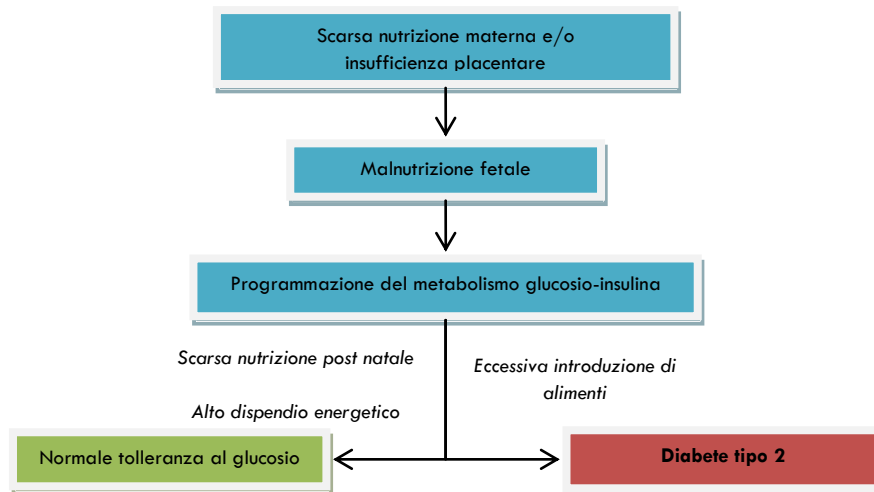


Figura 15. Ipotesi del fenotipo risparmiatore.

L'importanza di diversi fattori di rischio per il DM2 differisce tra le etnie, ma l'aumento di rischio associato alla storia familiare sembra l'elemento più costante (225), sebbene il suo effetto relativo tenda a diminuire con l'incremento di prevalenza del DM2 nelle popolazioni. Il valore predittivo di una storia familiare di DM2 è relativamente basso anche in soggetti giovani i cui familiari non hanno ancora sviluppato la malattia. Altri fattori di rischio sono un basso livello di attività fisica, l'obesità addominale e la presenza di SM (226-227). Inoltre, un'elevata concentrazione di glucosio di per se è un forte elemento predittore di sviluppo di DM2 (225, 228). Nello studio prospettico Botnia, 2115 individui non diabetici sono stati seguiti per sei anni. Ciò ha consentito di dimostrare che questi soggetti, con una storia familiare di DM2, con un BMI ≥ 30 Kg/m² e una glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dl, avevano un rischio 16 volte più alto di sviluppare DM2 (225).

Data l'importanza dei fattori genetici per la suscettibilità al DM2, si ritiene che la prevenzione possa essere condotta ad un livello superiore, cioè individuando tali geni di suscettibilità. La determinazione delle combinazioni genotipiche del DM2 e delle interazioni gene-ambiente potrà, infatti, chiarire il ruolo dei fattori genetici ed ambientali nello sviluppo della malattia, potrà fornire un nuovo strumento per l'identificazione degli individui

ad alto rischio, che potrebbero avere maggior beneficio dalla prevenzione, e potrà anche fornire misure preventive migliori e personalizzate, basate sulle informazioni genetiche.

Storia naturale del diabete tipo 2

Il mantenimento dell'omeostasi glucidica dipende da tre fondamentali meccanismi operanti in sintonia: la stimolazione della secrezione pancreatica di insulina, la soppressione insulino-mediata della produzione endogena di glucosio e la stimolazione insulino-mediata dell'utilizzazione periferica del glucosio.

Nel DM 2 si riscontrano due alterazioni fisiopatologiche fondamentali (229): un difetto, sia qualitativo che quantitativo, della secrezione insulinica da parte della β -cellula e l'insulino-resistenza dei tessuti periferici (fegato, muscolo e tessuto adiposo). In soggetti con predisposizione genetica, l'aumento del peso corporeo, associato ad uno stile di vita sedentario, determinano l'istaurarsi di una condizione di insulino-resistenza che, affiancata da una graduale riduzione della funzione β -cellulare, può portare ad una condizione di alterata regolazione glicemica (IFG o IGT) e quindi elevato rischio di progressione verso il DM2 (Fig. 16).

Figura 16. Fisiopatologia del diabete mellito tipo 2: alterazioni che portano al deterioramento dell'omeostasi glucidica.

Nella popolazione diabetica esistono soggetti con prevalente insulino-resistenza e altri con prevalente deficit insulinico ma, nella maggior parte dei casi (75%), i difetti coesistono. La concomitanza di insulino-resistenza e ridotta secrezione insulinica determinano

un'alterata utilizzazione del glucosio a livello del tessuto muscolare, un'inadeguata modulazione della produzione endogena di glucosio ed un'aumentata mobilitazione di acidi grassi da parte del tessuto adiposo.

- Insulino-resistenza. L'insulino-resistenza è una condizione pressoché universale nel paziente con DM2 e rappresenta la risultante dell'interazione di fattori genetici in gran parte poco noti e fattori ambientali (attività fisica, alimentazione, età, ...). L'obesità è un potentissimo moltiplicatore dell'insulino-resistenza e come tale è uno dei principali fattori predisponenti per il DM2. La condizione di insulino-resistenza è spesso associata ad alterazioni metaboliche (IFG/IGT, ipertrigliceridemia e bassi livelli di colesterolo-HDL), obesità centrale (in particolare viscerale), ipertensione, microalbuminuria, disfunzione endoteliale, alterazioni del sistema coagulativo e fibrinolitico, iperuricemia, infiammazione che configurano il quadro di SM. Il difetto dell'azione dell'insulina si esplica principalmente a livello dei tessuti periferici (Fig. 17).

Figura 17. Conseguenze dell'insulino-resistenza a livello dei tessuti periferici.

A livello del muscolo scheletrico la ridotta capacità dell'insulina nel promuovere l'utilizzazione di glucosio ed il suo immagazzinamento sotto forma di glicogeno contribuisce all'iperglicemia della fase post-prandiale.

A livello del tessuto adiposo la resistenza all'insulina si traduce in una ridotta utilizzazione di glucosio ed in un aumento della lipolisi con elevazione degli FFA circolanti. L'aumentato afflusso di FFA contribuisce all'insulino-resistenza a livello del tessuto muscolare (230). Elevate concentrazioni di FFA, insulino-resistenza epatica ed un eccesso relativo di glucagone comportano un'aumentata attività gluconeogenetica epatica che sostiene un eccesso di produzione di glucosio da parte del fegato in condizioni basali ed una mancata soppressione nelle fasi post-prandiali.

- Deficit di secrezione β -cellulare. Un certo grado di insulino-resistenza è presente già in fasi molto precoci della malattia, ma sarebbe la perdita della funzione secretoria il vero segna-passi della comparsa di intolleranza glucidica prima e di diabete manifesto poi. Infatti, una franca iperglicemia (DM2) non si manifesta fin quando non si sviluppa un difetto della secrezione insulinica. Nelle fasi iniziali del DM2, in risposta allo stato di insulino-resistenza, un aumento compensatorio della secrezione insulinica da parte delle β -cellule pancreatiche è in grado di mantenere i livelli circolanti di glicemia nella norma. Con il progredire del difetto, la secrezione pancreatica di insulina si riduce progressivamente, causando iperglicemia. Caratteristica è la perdita della prima fase di secrezione insulinica, evento che precede lo sviluppo di DM2. La perdita della fase acuta di secrezione insulinica non è un semplice indicatore di precoce disfunzione della β -cellula, ma può rappresentare un meccanismo fisiopatologico determinante dell'iperglicemia osservata durante OGTT e dopo il pasto. La mancanza di una rapida risposta all'introduzione di nutrienti si associa ad un'incompleta soppressione della produzione endogena di glucosio, con conseguente riduzione della tolleranza glucidica. Come risultato di queste alterazioni, si sviluppa iperglicemia post-prandiale (tipica nelle fasi iniziali della malattia) seguita più tardivamente da iperglicemia a digiuno. Il progressivo aumento della glicemia gioca un ruolo importante nel favorire la progressione dell'insulino-resistenza e del difetto di secrezione (glucotossicità), venendosi così ad instaurare un circolo vizioso.

Appare, quindi, chiaro che la storia naturale del DM2 è lenta e caratterizzata da alterazioni metaboliche che precedono la comparsa di iperglicemia conclamata. La fase in cui sono presenti alterazioni dell'omeostasi glucidica, ma con livelli glicemici sono sotto il *cut-off* stabilito per la diagnosi di DM2 è definita pre-diabete o disglucemia. Sebbene IFG e IGT conferiscano un rischio simile di sviluppare DM2, esse sono alterazioni metaboliche caratterizzate da differenti difetti fisiopatologici.

- Concentrazioni di glucosio nelle alterazioni minori della regolazione glicemica. I soggetti con IFG e IGT differiscono non solo per le concentrazioni glicemiche a digiuno e 2 ore dopo OGTT, ma anche in differenti punti della curva che segue il carico orale di glucosio (231-232). Nel soggetti con normale tolleranza glucidica (NGT = *Normal Glucose Tolerance*) e con glicemia a digiuno <100 mg/dl, le concentrazioni di glucosio dopo OGTT aumentano progressivamente, raggiungendo il picco fra 30' e 60' dopo il carico, per poi ridursi a valori <140 mg/dl a 2 ore dal carico. Il picco glicemico raramente supera 150-160 mg/dl nei soggetti NGT.

I soggetti con IGT, rispetto agli NGT, hanno glicemia a digiuno sovrapponibile, ma dopo OGTT la glicemia aumenta rapidamente a 30' e continua a salire dopo 60', rimanendo elevata (fra 140 e 200 mg/dl) a 2 ore dal carico. Solitamente la glicemia a 60' non differisce da quella a 120'. Pertanto, nei soggetti con IGT, si possono evidenziare due anomalie nella concentrazione di glucosio durante OGTT: rapida e continua ascesa della glicemia e mancato declino dei valori glicemici a 120' dal carico.

Al contrario, i soggetti IFG presentano valori più elevati di glicemia a digiuno rispetto agli NGT o agli IGT. Dopo ingestione di glucosio, la glicemia a 30' e 60' aumenta con valori superiori a quelli osservati nei soggetti NGT e IGT, ma si riduce progressivamente fino a raggiungere valori <140 mg/dl a 120'. Pertanto, i soggetti IFG si caratterizzano per gli elevati livelli di glicemia a digiuno ed un precoce e marcato incremento della glicemia subito dopo il carico di glucosio.

- Insulino-resistenza nelle alterazioni minori della regolazione glicemica. Negli studi epidemiologici la sensibilità insulinica viene solitamente valutata mediante misure surrogate come i livelli di insulinemia a digiuno o l'indice HOMA-IR. In tutte le popolazioni, sia soggetti IFG sia gli IGT si caratterizzano per livelli di insulinemia a digiuno e HOMA-IR più elevati rispetto agli NGT, a indicare uno stato di maggior insulino-resistenza (234-235). Impiegando queste misure di sensibilità insulinica, i soggetti IFG appaiono più insulino-resistenti degli IGT, al contrario di quanto si osserva negli studi con clamp euglicemico iperinsulinemico. In realtà, poiché le differenti metodiche valutano la presenza di insulino-resistenza in differenti distretti corporei (fegato le prime due e muscolo la terza), è possibile sostenere che i soggetti IFG e gli IGT abbiano differenti gradi di sensibilità insulinica nei vari distretti corporei. Pertanto, i soggetti IFG presenterebbero insulino-resistenza soprattutto a livello epatico dato che l'insulinemia a digiuno e l'indice HOMA-IR riflettono primariamente l'insulino-resistenza a questo livello. Tale osservazione trova conferma negli studi in cui è stata valutata la

sensibilità insulinica a livello epatico mediante misurazione della produzione epatica di glucosio con l'impiego di glucosio triziato (235-236). Questi studi hanno documentato solo una modesta soppressione insulino-mediata della produzione epatica di glucosio nei soggetti IFG rispetto agli IGT e ancor più rispetto agli NGT. Al contrario, negli studi che hanno valutato la sensibilità insulinica mediante clamp euglicemico iperinsulinemico, è stato osservato un basso utilizzo di glucosio stimolato dall'insulina nei soggetti IGT rispetto agli NGT, mentre l'utilizzo di glucosio nei soggetti con IFG è risultato normale o aumentato (236-237). Poiché l'utilizzo di glucosio stimolato dall'insulina durante clamp misura primariamente (~90%) la sensibilità insulinica a livello muscolare, si può dedurre che i soggetti con IGT sono caratterizzati da insulino-resistenza soprattutto a livello muscolare.

Non sembrano esserci, invece, sostanziali differenze nel grado di insulino-resistenza a livello del tessuto adiposo nei soggetti con IGT rispetto agli IFG. Dato che l'insulina è un potente inibitore della lipolisi, la presenza di alterati livelli circolanti di FFA può rappresentare un indice indiretto di insulino-resistenza a livello del tessuto adiposo (238). I soggetti con IGT, nonostante abbiano elevati valori di insulinemia a digiuno, si caratterizzano per elevati livelli plasmatici di FFA a digiuno, suggerendo uno stato di resistenza all'azione antilipolitica dell'insulina (239). Al contrario, i soggetti con IFG presentano solitamente concentrazioni di FFA a digiuno sovrapponibili a quelle riscontrate nei soggetti NGT, suggerendo un tasso di lipolisi più o meno normale (239). Questo viene garantito da livelli di insulinemia a digiuno più elevati. Pertanto, nei soggetti IFG, in condizioni di normo-insulinemia a digiuno, ci si potrebbe attendere un aumento della lipolisi e di conseguenza delle concentrazioni di FFA sovrapponibile a quello che si osserva negli IGT. Pertanto, l'insulino-resistenza a livello del tessuto adiposo è presente sia nei soggetti con IFG sia nei soggetti con IGT.

In conclusione, i soggetti IFG sono caratterizzati da insulino-resistenza a livello epatico con normale sensibilità insulinica a livello muscolare, mentre i soggetti IGT presentano marcata insulino-resistenza a carico del muscolo scheletrico ed una modesta insulino-resistenza epatica.

Si noti che l'entità della riduzione (~30-35%) della sensibilità insulinica a livello muscolare che si osserva nei soggetti con IGT è paragonabile a quella che si riscontra nei soggetti NGT che hanno parenti di primo grado diabetici, suggerendo che l'insulino-resistenza muscolare è, almeno in parte, ereditaria e precede lo sviluppo di DM2 (240-241).

- Secrezione insulinica nelle alterazioni minori della regolazione glicemica. Sebbene l'insulino-resistenza sia una manifestazione precoce nella storia naturale del DM2 (ad esempio nei soggetti IGT e negli NGT figli di due genitori diabetici), il principale fattore responsabile dello sviluppo di DM2 è la progressiva riduzione della funzione β -cellulare (242). La secrezione di insulina stimolata dal glucosio (misurata come C-peptide durante OGTT) è alterata sia nei soggetti con IFG sia in quelli con IGT, documentando un'inadeguata funzione β -cellulare. Tuttavia, i difetti nella funzione β -cellulare sembrano diversi nei soggetti IGT rispetto a quelli IFG. Infatti, mentre i soggetti con IGT hanno difetti severi sia della prima (0-30') che della seconda (60-120') fase di secrezione insulinica, i soggetti con IFG presentano alterazioni solo nella prima fase di secrezione insulinica, mentre hanno una seconda fase di secrezione più elevata del normale (243). Quando la funzione β -cellulare, valutata mediante *Disposition Index* (espressione del rapporto fra secrezione insulinica e insulino-resistenza), viene correlata alla glicemia a digiuno (244) o alla glicemia a 2 ore dall'OGTT (245), si osserva che la riduzione della funzione β -cellulare si rende evidente anche all'interno dei valori di normalità della glicemia e si riduce progressivamente con l'aumentare della concentrazione glicemica. I meccanismi alla base del danno β -cellulare non sono ancora stati del tutto chiariti, ma sembrano essere molteplici. In condizioni fisiologiche, l'assunzione di glucosio per via orale determina la secrezione intestinale degli ormoni incretinici GIP (*Gastric Inhibitory peptide*) e GLP-1 (*Glucagon Like Peptide*). GLP-1 e GIP agiscono, in concerto con l'iperglicemia, stimolando le β -cellule, con potenziamento della secrezione di insulina glucosio-dipendente. Una riduzione dei livelli circolanti di ormoni incretinici (GLP-1) o la resistenza all'azione di questi ormoni (GIP) nei soggetti con disglycemia potrebbe contribuire a ridurre la sensibilità delle β -cellule al glucosio e compromettere la secrezione insulinica, con conseguente incremento della glicemia a 2 ore dall'OGTT (246). Anche gli studi che hanno valutato la secrezione insulinica dopo infusione endovenosa di glucosio (IVGTT = *Inta-Venus Glucose Tolerance Test*) hanno riportato una compromissione della prima e della seconda fase di secrezione insulinica nei soggetti con IGT e confermato una severa riduzione della prima fase di secrezione insulinica con normale seconda fase di secrezione nei soggetti con IFG (247-248). L'alterazione della funzione β -cellulare dopo IVGTT suggerisce che il deficit della sensibilità al glucosio delle β -cellule è, almeno in parte, intrinseco e non interamente dovuto all'alterata funzione incretinica osservata nei soggetti con IGT.

Diabete, disglycemia e rischio cardiovascolare

E' noto che il DM2 si associa ad un'aumentata incidenza di complicanze cardiovascolari su base aterosclerotica, soprattutto a carico delle arterie coronariche, delle arterie periferiche e del sistema cerebrovascolare. Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nei pazienti diabetici e, solitamente, sono più severe, estese e caratterizzate da un tasso di morbidità e mortalità più elevato rispetto a quello dei soggetti non diabetici (249). I pazienti con DM2 colpiti da un evento coronarico acuto hanno una prognosi peggiore, indipendentemente dalla possibilità di poter ricevere un trattamento di rivascularizzazione mediante angioplastica o by-pass aorto-coronarico (250). La natura e la distribuzione dell'aterosclerosi nel DM2 rendono peggiori la prognosi e la risposta alla rivascularizzazione. Inoltre, tali complicanze insorgono più precocemente e spesso risultano essere asintomatiche nei pazienti diabetici (251). Questo aumentato rischio sembra essere solo parzialmente spiegato dall'iperglicemia (252), dato che il processo aterosclerotico riconosce una base patogenetica multifattoriale. D'altra parte, un'associazione diretta fra grado di controllo glicemico e severità del profilo di rischio cardiovascolare potrebbe essere supportata dall'osservazione che nei pazienti con DM2 la prevalenza di un cluster di fattori di rischio cardiovascolare, come la SM, aumenta con il peggiorare dei livelli di HbA1c (253). Inoltre, la mortalità cardiovascolare aumenta in maniera esponenziale in presenza di uno o più fattori di rischio tradizionali, quali ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa e fumo, ma l'iperglicemia determina un ulteriore incremento del rischio (254).

Gli studi epidemiologici, inoltre, suggeriscono che anche le alterazioni minori della regolazione glicemica che precedono il DM2 si possono associare ad un aumentato rischio cardiovascolare. Numerose evidenze suggeriscono, infatti, che il rischio di morbidità e mortalità cardiovascolare aumenta con l'aumentare delle concentrazioni plasmatiche di glucosio e dei livelli di HbA1c, anche ben al di sotto dei valori diagnostici per DM2 (255-257). La prima indicazione che l'iperglicemia potesse rappresentare un fattore di rischio cardiovascolare anche quando più bassa rispetto a quella riscontrata nel DM2, risale alla pubblicazione dei risultati di studi osservazionali come il *Bedford Study* (258) e il *Tecumseh Study* (259), ma fu solo successivamente, con la pubblicazione della meta-analisi di Coutinho e collaboratori (260), che teneva conto di 20 studi con *follow-up* medio di 12.4 anni per un totale di 95783 soggetti non diabetici, che l'ipotesi dell'esistenza di un'associazione esponenziale fra eventi cardiovascolari e iperglicemia, anche nell'ambito di

valori inferiori al range di IFG e IGT. Studi successivi hanno supportato tale osservazione in diverse popolazioni (261-262), suggerendo pertanto che l'iperglicemia sia un fattore di rischio cardiovascolare continuo e che non sembra possibile identificare alcun valore soglia in grado di distinguere tra coloro che svilupperanno eventi cardiovascolari e coloro che invece saranno protetti da tale evenienza. Ad esempio, il *Paris Prospective Study* (263) ha documentato non solo un significativo incremento del rischio di mortalità totale e per coronaropatia con il progressivo incremento della glicemia a digiuno o 2h dopo OGTTT, ma anche l'esistenza di una relazione con andamento a J tra glicemia a digiuno o 2h dopo OGTT e mortalità totale o cardiovascolare, con un incremento di rischio anche tra i soggetti che avevano valori più bassi di glicemia rispetto a quelli con valori normali.

Il contributo della glicemia post-prandiale alle complicanze cardiovascolari è ritenuto, comunque, superiore rispetto a quello della glicemia a digiuno da vari studi. Nello studio DECODE, ad esempio, il rischio di mortalità nei soggetti IFG era pari a 1.21 (95%IC 1.05-1.41) e saliva a 1.51 (95%IC 1.32-1.72) nei soggetti IGT (264). Un'analisi successiva del database del DECODE evidenziava che, dopo aggiustamento per fattori di rischio confondenti, il rischio di mortalità cardiovascolare non aumentava in funzione della glicemia a digiuno, ma di quella post-carico (265). Similmente, nel *Funagata Diabetes Study* (266), la mortalità cardiovascolare nei soggetti IGT risultava molto vicina a quella dei soggetti con DM2 e ben più alta di quella osservata nei soggetti IFG (Fig. 18).

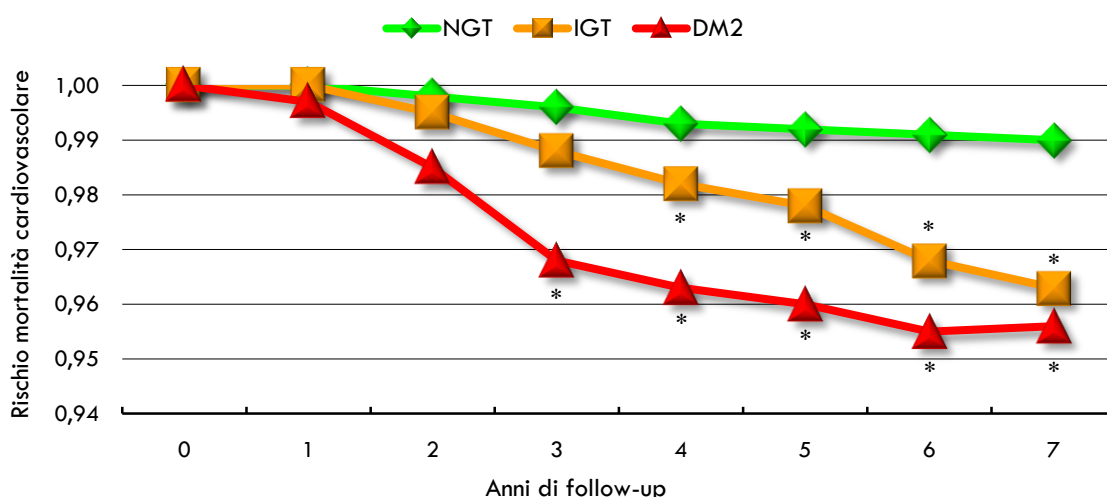


Figura 18. Mortalità per cause cardiovascolari in relazione al grado di tolleranza glucidica. *Funagata Diabetes Study*. * $p < 0.05$

Nell'*Hoorn Study* (267), invece, si osservava una correlazione lineare fra mortalità cardiovascolare, HbA1c e glicemia sia a digiuno sia post-carico, con valori anche inferiori a quelli diagnostici per DM2. Tuttavia, gli autori hanno recentemente osservato che la relazione fra IFG e rischio cardiovascolare dipendeva dalla conversione a DM2 durante il periodo di *follow-up* (Fig. 19; 268). Infatti, i soggetti IFG che sviluppavano DM2 presentavano un rischio di mortalità cardiovascolare doppio rispetto ai soggetti NGT (glicemia a digiuno 110-125 mg/dl: 2.47 [1.17-5.19]; glicemia a digiuno 100-125 mg/dl: 2.14 [1.12-4.10]), mentre i soggetti IFG che non sviluppavano DM2 non mostravano un rischio significativamente più elevato (glicemia a digiuno 110-125 mg/dl: 1.50 [0.72-3.15]; glicemia a digiuno 100-125 mg/dl: 1.15 [0.69-1.93]).

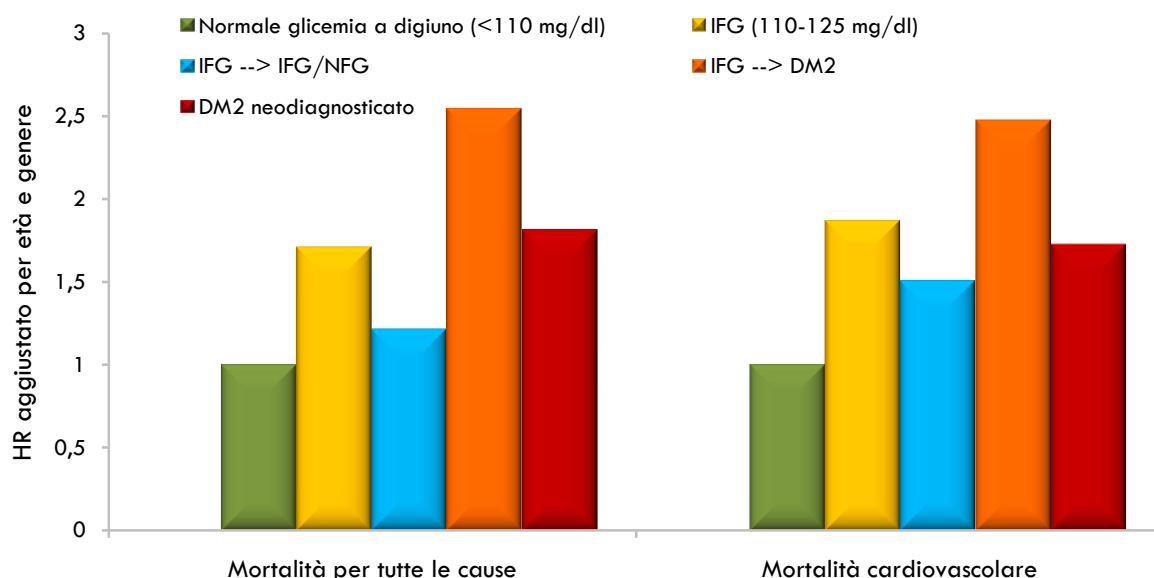


Figura 19. Rischio di mortalità per tutte le cause e per cause cardiovascolari, aggiustato per età e genere, in relazione alla glicemia a digiuno e alla progressione o meno verso il diabete tipo 2. *Hoorn Study*.

D'altra parte, nell'ambito di questo studio, si osservava anche che il rischio di mortalità aumentava con l'aumentare dei livelli di HbA1c. Similmente, nello studio EPIC-Norfolk (*Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and nutrition*) (269), condotto su circa 5000 soggetti con HbA1c <5%, si osservava una correlazione diretta fra mortalità totale e coronarica e valori di HbA1c, con un incremento del 41% per ogni aumento dell'1% dell'HbA1c. Nel *Rancho Bernardo Study* (270), tuttavia, questa associazione si evidenziava solo nelle donne e non negli uomini. Pochi studi hanno confrontato la capacità

predittiva per rischio cardiovascolare delle tre misure della glicemia nella stessa popolazione. Recentemente, lo studio *AusDiab* (271), che ha arruolato oltre 10.000 soggetti di età ≥ 25 anni senza DM2, ha documentato che dopo un *follow-up* di 7 anni, la glicemia a digiuno aveva un potere discriminante per mortalità cardiovascolare superiore alla glicemia post-prandiale o ai valori di HbA1c. Suggestiva, inoltre, che la capacità della glicemia a digiuno e post-prandiale di identificare soggetti ad alto rischio di patologie cardiovascolari è modesta quando vengono presi in considerazione anche gli altri fattori di rischio tradizionali. D'altra parte, anche nel *San Antonio Heart Study* (272), sebbene la glicemia a digiuno e 2h dopo OGTT fossero predittori di eventi cardiovascolari, la miglior identificazione dei soggetti ad alto rischio cardiovascolare si otteneva utilizzando un'analisi multivariata che comprendeva i classici fattori di rischio, come profilo lipidico, pressione arteriosa, BMI, fumo, familiarità per patologie cardiovascolari. In tale studio, pertanto, la glicemia 2h dopo OGTT non sembra migliorare la predizione di eventi cardiovascolari.

In conclusione, la glicemia di per sé sembra essere un fattore di rischio cardiovascolare, ma nella valutazione di tale relazione non si deve dimenticare che glicemia a digiuno e post-carico, così come l'HbA1c, riflettono processi metabolici differenti e potrebbero comportarsi in modo diverso nell'associazione con la mortalità ed il rischio cardiovascolare. Inoltre, numerosi fattori potrebbero contribuire a spiegare la variabilità di tali osservazioni: metodiche di laboratorio differenti, fattori confondenti, dati limitati per la popolazione femminile. Comunque, combinando i risultati di numerosi studi ed analizzando il contributo dei diversi indici glicemici, si può affermare che i soggetti appartenenti alle categorie più alte di glicemia hanno un rischio di malattie cardiovascolari del 36% più elevato rispetto alla categoria più bassa, indipendentemente dal tipo di indice glicemico valutato. Inoltre, tale rischio appare marcatamente aumentato nelle coorti che hanno considerato la popolazione femminile (273). Sembra, infatti, che esista una differenza genere-specifica nel rischio cardiovascolare correlato al DM2. Nelle donne, il DM2 si associa ad un profilo di rischio peggiore, caratterizzato da livelli di glicemia più elevati rispetto agli uomini, da un peggiore controllo della pressione arteriosa e del profilo lipidico e da una maggiore prevalenza della SM. Il più alto rischio cardiovascolare associato al DM2 nelle donne sembra anche riflettere un differente grado di intensità del trattamento dei fattori di rischio rispetto agli uomini (274). In fine, le attuali evidenze indicano che l'iperglicemia aumenta il rischio cardiovascolare anche nei soggetti con alterazioni minori della regolazione glucidica. Di conseguenza, le categorie *borderline* di alterata regolazione glicemica (IFG e IGT) dovrebbero essere considerate non solo fattori di rischio per lo sviluppo di DM2, ma

anche fattori associati allo sviluppo di complicanze sia macrovascolari che microvascolari (275). Si deve, comunque, tener presente che una recentissima meta-analisi sul rischio cardiovascolare nei soggetti con disglycemia suggerisce che IFG e IGT sono associati solo con un modesto incremento del rischio cardiovascolare (276). Infatti, il RR stimato cardiovascolare dei soggetti IFG secondo i criteri ADA 1997 (glicemia a digiuno compresa fra 110 e 125 mg/dl) era 1.20 (95% IC 1.12-1.28) e 1.18 (95% IC 1.09-1.28) per gli IFG definiti secondo i criteri ADA 2003 (glicemia a digiuno compresa fra 100 e 125 mg/dl). Per i soggetti IGT il RR stimato era 1.20 (95% IC 1.07-1.34). Nei soggetti IFG+IGT si osservava un RR stimato di 1.10 (95% IC 0.99-1.23). Non si osservavano differenze significative nel rischio stimato dei soggetti con disglycemia nei due generi. In fine, non si deve dimenticare che i dati provenienti dagli studi osservazionali o dalle meta-analisi consentono solo di identificare associazioni a livello di popolazione, ma necessitano di essere sostenuti da esperimenti di fisiopatologia e da studi clinici di intervento in grado di confermare l'utilità del controllo della glicemia nella prevenzione della morbidità e mortalità cardiovascolare nei soggetti con disglycemia.

Screening del diabete

Il DM2 è una condizione caratterizzata da un periodo silente o asintomatico di lunga durata, durante il quale il soggetto non si accorge della malattia, ma nel corso del quale sono operanti i meccanismi responsabili dello sviluppo delle complicanze sia micro- che macro-vascolari. Al momento della diagnosi clinica il 20-30% dei casi può presentare complicanze microvascolari (277) e, di frequente, il DM2 viene identificato nei reparti di terapia intensiva coronarica in pazienti ammessi con infarto miocardico. La durata precisa del periodo di latenza non è nota, ma si ritiene che mediamente sia di 4-7 anni con punte di 10-12 anni. In accordo con tali stime, lo screening di una popolazione potrebbe anticipare la diagnosi clinica del DM2 di 5-6 anni.

Le raccomandazioni correnti per lo screening del DM2 variano a seconda del paese e delle organizzazioni scientifiche. L'ADA (278) raccomanda di effettuare lo screening del DM2 negli adulti asintomatici sovrappeso od obesi ($BMI \geq 25 \text{ Kg/m}^2$) che hanno uno o più dei seguenti fattori di rischio: vita sedentaria, familiarità positiva per DM2 (parente di primo grado), appartenenza ad un gruppo etnico ad alto rischio (ispanici, asiatici, africani), pregresso GDM/macrosomia fetale ($>4 \text{ Kg}$), ipertensione arteriosa ($\geq 140/90 \text{ mmHg}$ o terapia anti-ipertensiva), bassi livelli di colesterolo HDL $<35 \text{ mg/dl}$ e/o trigliceridi $>250 \text{ mg/dl}$, sindrome dell'ovaio policistico, $HbA1c \geq 5.7\%$ o IGT o IFG in precedenti valutazioni, altre condizioni cliniche associate ad insulino-resistenza (obesità severa, acanthosis nigricans), storia di patologie cardiovascolari. In coloro che non hanno fattori di rischio lo screening del DM2 dovrebbe essere effettuato a partire dai 45 anni d'età. In caso di test normale, la valutazione dovrebbe essere ripetuta ad intervalli di 3 anni.

Inoltre, poiché l'incidenza di DM2 è in aumento anche nei bambini e negli adolescenti, lo screening del DM2 dovrebbe essere esteso a questa fascia d'età. In particolare, andrà effettuato ogni 3 anni a partire dal 10° anno d'età (o dall'epoca della pubertà) nei giovani in sovrappeso (definito come $BMI > 85^\circ$ percentile per età e sesso, peso x altezza $> 85^\circ$ percentile o peso $> 120\%$ del peso ideale con almeno due fra i seguenti fattori di rischio: storia familiare positiva per DM2 (parenti di primo o secondo grado), appartenenza a gruppi etnici ad alto rischio, presenza di segni o condizioni associate ad insulino-resistenza (acanthosis nigricans, ipertensione, dislipidemia, sindrome dell'ovaio policistico, peso alla nascita inferiore a quello previsto per l'età gestazionale), storia materna di diabete o GDM nel corso della gravidanza del bambino in esame.

L'IDF (*International Diabetes Federation*) raccomanda uno screening opportunistico del DM2 nei soggetti con fattori di rischio noti, delegando tale compito in prima istanza ai medici di medicina generale (279).

Le recenti raccomandazioni europee per la prevenzione del diabete (280) propongono di effettuare primariamente lo screening nei soggetti a rischio più elevato (IFG±IGT±SM).

Similmente, le società scientifiche italiane (SID = Società Italiana di Diabetologia e AMD = Associazione Medici Diabetologi) raccomandano programmi di screening rivolti alle persone ad alto rischio di DM2 (screening selettivi; Tab. 5) effettuati in occasione di un controllo medico (screening opportunistici).

Tabella 5. Soggetti a rischio di diabete tipo 2 secondo le società scientifiche italiane.

| Soggetti a rischio di diabete tipo 2 | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> – IFG o IGT o pregresso diabete gestazionale o HbA1c 6-6,49% (solo con dosaggio standardizzato). | |
| <ul style="list-style-type: none"> – Età ≥45 anni, specialmente se con BMI ≥25 kg/m² | |
| <ul style="list-style-type: none"> – Età <45 anni e una o più tra le seguenti condizioni: <ul style="list-style-type: none"> • inattività fisica • familiarità di primo grado per diabete tipo 2 (genitori, fratelli); • appartenenza a gruppo etnico ad alto rischio; • ipertensione arteriosa (≥ 140/90 mmHg) o terapia antipertensiva in atto; • bassi livelli di colesterolo HDL (≤ 35 mg/dl) e/o elevati valori di trigliceridi (≥250 mg/dl); • nella donna, parto di un neonato di peso >4 kg; • basso peso alla nascita (<2,5 kg) • sindrome dell'ovaio policistico o altre condizioni di insulino-resistenza come l'<i>acanthosis nigricans</i>; • evidenza clinica di malattie cardiovascolari | |
| <ul style="list-style-type: none"> – Ragazzi/e di età >10 anni, con BMI >85° percentile e due tra le seguenti condizioni: <ul style="list-style-type: none"> • familiarità di primo o secondo grado per diabete tipo 2; • madre con diabete gestazionale; • segni di insulino-resistenza o condizioni associate (ipertensione, dislipidemia, <i>acanthosis nigricans</i>, ovaio policistico, basso peso alla nascita); • appartenenza a gruppo etnico ad alto rischio | |

Sino ad oggi non sono stati eseguiti studi clinici controllati sullo screening del diabete. L'identificazione precoce del diabete potrebbe permettere al clinico di offrire una serie di interventi da attuare nella fase di disglycemia, quali lo stretto controllo glicemico, l'uso più intensivo e mirato di farmaci antiipertensivi, l'impiego più aggressivo di ipolipemizzanti ed

aspirina, l'impiego di programmi per modificare lo stile di vita e la cessazione del fumo di sigaretta. Evidenze dirette dimostrano che molti di tali interventi sono capaci di migliorare gli esiti quando intrapresi dopo la diagnosi clinica. L'entità di benefici aggiuntivi nel caso di un loro più precoce inizio, durante la fase pre-clinica, dovrebbe essere estrapolata da evidenze indirette. Gli effetti associati alla precocità degli interventi dipendono dall'entità della riduzione del rischio assoluto delle complicanze verso cui sono indirizzati gli interventi stessi. L'impatto di un precoce intervento, come uno stretto controllo della glicemia, al fine di ridurre la cecità, l'insufficienza renale avanzata, o le amputazioni agli arti inferiori - che si verificano di fatto solo 15 anni dopo la diagnosi – resta, tuttavia, ancora da dimostrare. Al contrario, l'impatto di intervenire precocemente con un controllo intensivo della pressione arteriosa avendo come bersaglio le malattie cardiovascolari, appare più consistente nei primi dieci anni dalla diagnosi. Considerando una serie di assunzioni, il numero di individui da sottoporre a screening (NNS) per prevenire, nell'arco di 5 anni, un caso di cecità è 4300 attuando uno stretto controllo glicemico, mentre un NNS di 900 risulta necessario per prevenire un evento cardiovascolare se si attua uno stretto controllo della pressione arteriosa, sempre nei pazienti di nuova diagnosi (281).

Un ulteriore aspetto dello screening del diabete che dovrebbe essere affrontato in studi controllati riguarda le conseguenze dal punto di vista etico, psicologico e sociale ed il rapporto costo-beneficio dell'identificazione dei soggetti con disglycemia.

Strumenti per lo screening del diabete e per l'identificazione dei soggetti a rischio

Storicamente lo screening del DM2 è stato effettuato mediante dosaggio della glicemia a digiuno eventualmente associato ad OGTT. Tali procedure consentono anche di identificare soggetti con alterata regolazione glucidica ad alto rischio di DM2, in particolare: IFG o IGT o entrambe le situazioni contemporaneamente.

Le società scientifiche italiane SID e AMD suggeriscono che i programmi di screening basati sulla glicemia a digiuno hanno un più favorevole rapporto costo/efficacia rispetto a quelli basati su OGTT e ritengono che l'esecuzione di quest'ultimo possa essere presa in considerazione nei soggetti ad alto rischio (ad esempio in presenza di IFG) per meglio definire il rischio individuale di diabete e di malattie cardiovascolari. In caso di normalità del test di screening, i soggetti ad alto rischio dovrebbero essere riesaminati dopo 2-3 anni, considerando valutazioni anche più frequenti, sulla base dei risultati iniziali e della condizione di rischio globale. Inoltre, devono essere loro fornite indicazioni utili a modificare lo stile di vita e a ridurre i fattori di rischio di DM2 presenti.

Attualmente, l'ADA raccomanda per lo screening del DM2 di utilizzare indifferentemente emoglobina glicata (HbA1c), glicemia a digiuno o OGTT, in quanto le ritiene tutte misure appropriate. E' stato, infatti, recentemente proposto l'uso di HbA1c per lo screening e la diagnosi del DM2 (282), identificando come soggetti con DM2 coloro che hanno livelli di HbA1c $\geq 6.5\%$ e definendo ad alto rischio di sviluppare DM2 coloro che hanno livelli di HbA1c $\geq 6.0\%$ e $< 6.5\%$. La proposta di utilizzare i valori di HbA1c come strumento per la diagnosi di DM2 si basa sull'osservazione che HbA1c è una misura di iperglicemia cronica, dal momento che contiene informazioni sia sulla glicemia a digiuno che post-prandiale, correla bene con l'incidenza delle complicanze microvascolari (in particolare con l'incidenza di retinopatia), è un parametro con minor instabilità preanalitica e minor variabilità biologica rispetto alla glicemia a digiuno e non necessita di digiuno al momento del prelievo (283).

A fronte dei vantaggi citati, occorre ricordare che esistono alcuni svantaggi nell'impiego dell'HbA1c ai fini dello screening del DM2 (Tab. 6). Ad esempio, la determinazione dei valori di HbA1c può essere influenzata dall'etnia del soggetto in esame o dalla presenza di variabili pre-analitiche (emoglobinopatie, anemia emolitica, recente emorragia, trasfusione) che possono interferire in senso positivo o negativo sul risultato. Un altro

aspetto, di non trascurabile rilevanza, da tenere in debita considerazione, è il costo della determinazione, sensibilmente maggiore per l'HbA1c rispetto alla glicemia. Il limite maggiore all'uso dell'HbA1c per la diagnosi e lo screening del DM2 è, però, rappresentato dalla metodica, attualmente non ancora standardizzata.

D'altra parte, non esistono sostanziose evidenze a sostegno dell'utilità dell'HbA1c nel predire lo sviluppo di DM2 (Tab. 6). La misura dell'HbA1c potrebbe essere di grande valore in un processo di screening a fase successive o in associazione alla valutazione della glicemia a digiuno per identificare i soggetti da sottoporre a OGTT o gli individui a più alto rischio di sviluppare DM2 (284). Si deve, in fine, sottolineare che gli studi di prevenzione del DM2 sono stati fatti tutti in soggetti con IGT e non in soggetti con IFG o alterata HbA1c.

Tabella 6. Vantaggi e limiti dell'uso di HbA1c per la diagnosi e lo screening del diabete tipo 2.

| Vantaggi | Svantaggi |
|--|---|
| Non è necessario il digiuno del soggetto al momento del prelievo. | La determinazione può essere influenzata da variabili pre-analitiche non note (ad es. emoglobinopatie). |
| Si correla allo sviluppo delle complicanze croniche del diabete. | Maggior costo della determinazione rispetto alla glicemia. |
| Minor variabilità biologica intra-individuale rispetto alla glicemia. | La misura potrebbe essere non disponibile come quella della glicemia (ad es. Paesi in via di sviluppo). |
| Minore instabilità pre-analitica rispetto alla glicemia. | Necessità di adeguamento degli standard laboratoristici. |
| E' una misura integrata dell'iperglicemia cronica (riflette il controllo glicemico degli ultimi 2-3 mesi) e non subisce interferenze dalle variazioni rapide della glicemia. | |

Tutte le metodologie attualmente raccomandate per lo screening del DM2 tendono, comunque, ad identificare soggetti con DM2 non noto o alterazioni minori della regolazione glucidica. Nell'ottica di una prevenzione primaria del DM2 sarebbe, invece, opportuno impiegare strumenti a basso costo per identificare soggetti ad alto rischio quando sono ancora NGT. Su questo tipo di considerazione si basa un approccio alternativo che prevede l'uso di questionari o di dati clinici raccolti di routine. Sono stati ideati numerosi modelli di predizione per identificare soggetti ad alto rischio di sviluppare DM2, nella Tabella 7 sono riportati alcuni esempi (285-287). Il questionario più conosciuto è quello sviluppato dal gruppo di ricerca dello studio Finlandese di prevenzione del DM2, il FINDRISC (*FINnish type 2 Diabetes Risk Score*) (288). L'elaborazione di questo ed altri questionari è stata resa possibile grazie agli studi epidemiologici che hanno permesso di identificare i fattori di

rischio correlati con lo sviluppo del DM2 (età, predisposizione familiare, obesità, attività fisica, sesso, ipertensione, pregresso GDM). Il calcolo del *risk score* si basa proprio sul peso dei singoli fattori di rischio connessi con lo sviluppo del DM2 e permette una quantificazione ed una stratificazione del rischio individuale. I questionari hanno un elevato valore predittivo, offrendo la possibilità di identificare il 70-80% degli individui con DM2 non noto e permettono di ridurre la misurazione della glicemia al 20-25% della popolazione.

Tabella 7. Principali algoritmi per identificare i soggetti a rischio di diabete. PPV = *Positive Predictive Value*, valore predittivo positivo. * Valuta il rischio di diabete a 10 anni. ** Valuta il rischio di diabete a 5 anni

| Studio | Fattori di rischio | Risk Score e probabilità | Sensibilità (%) | Specificità (%) | PPV (%) | |
|------------------|--|--|--|-----------------|---------|-----|
| FINDRISC* (285) | Età, Circonferenza vita, BMI, Familiarità, Uso di farmaci antiipertensivi, Iperglicemia, Esercizio fisico, Consumo frutta e verdura/die | <7 basso 7-11 appena elevato 12-14 moderato 15-20elevato >20 molto elevato | 73 | 83 | 16 | |
| SCHULZE ** (286) | Età, Circonferenza vita, Altezza, Uso di farmaci antiipertensivi, Consumo carne rossa, Consumo di pane, Consumo moderato alcool, Consumo caffè, Attività fisica, Ex fumatore o fumatore | <422 423-492 493-533 534-585 586-657 ≥658 | <1 1 - <2 2 - <3 3 - <5 5 - <10 ≥10 | 67,5 | 81 | 7,7 |
| IGLOO** (287) | Età, Circonferenza vita, Iperglicemia, Uso di farmaci antiipertensivi, Attività fisica, Consumo di frutta e verdura, Diagnosi di sindrome metabolica, Fattori di rischio cardiovascolare | Cut-off ≥9 elevato | 78 | 76 | 7-12 | |

In particolare, lo score del FINDRISC è stato costruito sulla base di un campione random della popolazione finlandese del *National Population Register* di entrambi i sessi e di età compresa tra 35 e 64 anni non trattato con farmaci antidiabetici che è stato seguito per 10 anni con *end-point* la comparsa di DM2 trattato con farmaci (*National Drug Registry*). Una regressione logistica multivariata che prevedeva come variabile dipendente il DM2 diagnosticato nel corso del *follow-up* è stata eseguita includendo come parametri indipendenti fattori di rischio di facile valutazione in assenza di test di laboratorio. Tale modello è stato utilizzato per assegnare a ciascuna delle variabili incluse un punteggio dalla cui somma emerge il *Diabetes Risk Score*. Sensibilità (la probabilità di un test positivo per i soggetti che svilupperanno il diabete nel *follow-up*) e specificità (la probabilità di un test negativo per i soggetti che non svilupperanno il diabete nel *follow-up*) sono state calcolate per ciascun livello del *Diabetes Risk Score* (285). Il modello, sviluppato in una coorte di 4.746 soggetti seguiti per 10 anni, è stato validato in una coorte indipendente di 4.615 individui seguiti per 5 anni. Età, BMI, circonferenza addominale, storia di trattamento

con farmaci anti-ipertensivi e di pregressi elevati valori glicemici, attività fisica e consumo giornaliero di frutta e/o vegetali sono stati selezionati dal modello statistico come variabili categoriche indipendenti. Il punteggio poteva variare da 0 a 20, indicando un rischio da lieve a molto elevato di sviluppare DM2 nell'arco dei 10 anni successivi. Il rischio di sviluppare il DM2 è molto modesto in pazienti con basso FINDRISC score, per cui questi soggetti possono essere esclusi da ulteriori procedure di screening senza incorrere nel problema di una percentuale non tollerabile di falsi negativi. Il dosaggio della glicemia a digiuno o l'esecuzione della OGTT non sono necessari per decidere cosa fare se il *Diabetes Risk Score* è elevato poiché tali individui possono tutti beneficiare del miglioramento dello stile di vita indipendentemente dai loro livelli glicemici.

Nella predizione del DM2 (trattato con farmaci) un punteggio ≥ 9 aveva una sensibilità del 78% e del 81% rispettivamente nella prima (10 anni di *follow-up*) e nella seconda coorte (5 anni di *follow-up*). Nelle due coorti, la specificità era pari a 77% e 76%, rispettivamente; il potere predittivo positivo pari a 13% e 5%. Nella coorte seguita per 10 anni ed utilizzata per sviluppare il *Risk Score*, l'incidenza del DM2 in uomini e donne aumentava dallo 0.3% e 0.6%, rispettivamente nei soggetti con score 0-3, al 2.4% e 1.3%, rispettivamente nei soggetti con score 4-8, al 10.5% e 6.6%, rispettivamente nei soggetti con score 9-12 e, infine, al 32.7% e 28.2%, rispettivamente negli individui con score 13-20. Risultati simili, se corretti per la durata del *follow-up*, sono stati osservati nella coorte di validazione del modello predittivo, seguita per 5 anni.

Le curve ROC dimostrano che il *Diabetes Risk Score* predice molto bene la comparsa del DM2 sia nella coorte seguita per 10 anni (AUC= 0.85) che in quella seguita per 5 anni (AUC= 0.87). Il *cut-point* ≥ 9 nel *Diabetes Risk Score* che individua circa il 25% della popolazione sottoposta allo screening (quartile alto) individua più del 70% dei casi incidenti di DM2.

Inoltre, l'analisi prospettica del rischio valutato mediante FINDRISC si associa all'evoluzione verso il DM2 nell'arco di 3 anni di *follow-up* (289), rendendo tale questionario uno strumento predittivo estremamente valido nella popolazione caucasica, probabilmente alcune modifiche saranno necessarie per l'applicazione in altri gruppi etnici (290).

La predizione delle patologie croniche come il DM2 può essere di grande aiuto nel guidare gli interventi di prevenzione e lo sviluppo della politica sanitaria, per tale motivo sempre maggior interesse viene posto nella ricerca di strumenti predittivi più accurati. L'idea che l'impiego di un maggior numero di elementi considerati nell'algoritmo di calcolo del rischio

si associ ad una migliore *performance* dello strumento predittivo, purtroppo non sembra essere sostenuto dalle evidenze. Ad esempio, nell'ambito del *Framingham Offspring Study* (291), un modello clinico semplice, basato sulle caratteristiche personali (età, BMI, familiarità per DM2, ma non genere) risultava un buon predittore di DM2 (AROC, 0.72), così come un modello basato su familiarità per DM2 ed obesità insieme a ipertensione, bassi livelli di colesterolo HDL, elevati trigliceridi e IFG, ma non elevati dimensioni della circonferenza vita (AROC, 0.85). Al contrario modelli clinici più complessi, che tenevano anche conto di glicemia a 2h dall'OGTT, indice HOMA-IR, indice HOMA-B, PCR ed altro, non miglioravano la capacità discriminativa del modello e non erano superiori ad un modello clinico più semplice (AROC, 0.850-0.854).

D'altra parte, i progressi ottenuti nell'ambito delle conoscenze sulla genetica del DM2 hanno indotto a valutare un possibile ruolo dell'analisi genetica nella predizione del DM2 (292), approccio che attualmente non sembra migliorare la predizione del DM2 che si ottiene con i comuni fattori di rischio. In 2377 partecipanti al *Framingham Offspring Study* (293) è stata, ad esempio, testata la capacità predittiva di uno score genetico basato sui polimorfismi di 18 loci associati con il DM2 ed è stato osservato che tale score era in grado di predire i nuovi casi di DM2 nella comunità studiata, ma forniva una predizione solo lievemente migliore rispetto al rischio valutato mediante i comuni fattori di rischio.

Appare, quindi, ancora prematuro l'impiego di indici genetici nella predizione del DM2. Probabilmente, in futuro, con l'ampliamento delle conoscenze in questo campo sarà possibile integrare gli attuali strumenti di predizione con analisi più complesse, al fine di effettuare una prevenzione individualizzata e mirata ai soggetti a più alto rischio. Attualmente le evidenze suggeriscono che semplici informazioni personali, eventualmente associate a parametri biochimici di routine, possono essere sufficienti ad ottenere una buona predizione del DM2, senza far ricorso all'analisi genetica o a parametri di laboratorio più complessi e costosi. Non si deve, inoltre, dimenticare che nella valutazione dell'applicabilità clinica degli strumenti predittivi occorre tener conto non solo della loro accuratezza, ma anche della loro semplicità, disponibilità e praticabilità d'uso, nonché del loro costo.

Definizione della popolazione target per la prevenzione del diabete

La prevenzione primaria del DM2 è stata proposta per la prima volta ottanta anni fa ed è stata sollecitata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (294). Sono stati proposti e realizzati numerosi progetti di intervento, basati su diverse strategie a seconda che il progetto fosse indirizzato all'intera popolazione o ad un gruppo di soggetti più ristretto e a rischio più elevato. In particolare si possono distinguere tre tipi di strategie:

- Strategie a monte (Up-stream). Programmi diretti alla popolazione generale che comprendono interventi di politica sanitaria e sociale per la promozione di stili di vita più salutari.
- Strategie intermedie (Mid-stream). Interventi diretti a popolazioni definite o comunità ad alto rischio, che si propongono di modificare lo stile di vita cercando così di influenzare il rischio di DM2.
- Strategie a valle (Down-stream). Programmi di intervento diretti ai soggetti ad alto rischio che mediante modificazione dello stile di vita (consigli su dieta ed esercizio fisico) o uso di farmaci si propongono di ridurre la conversione a DM2.

Al momento, non ci sono evidenze relative all'efficacia di un intervento su ampia scala come quelli di tipo *up-stream*. La semplice distribuzione di informazioni relative al rischio di DM2 e alla possibilità di ridurre il rischio non appare un approccio di popolazione sufficiente a ridimensionare l'epidemia di DM2. Per una prevenzione efficace è importante creare condizioni ambientali che favoriscano uno stile di vita sano. A tal scopo sono necessari programmi nazionali di prevenzione.

Una revisione della letteratura comparsa tra il 1990 e il 2001 (295) ha permesso di identificare 16 studi di intervento *mid-stream*, di cui 8 condotti negli USA su popolazioni ad alto rischio (Indiani-Americani, Messicani-Americani). Molti di questi lavori presentavano, però, delle limitazioni nel disegno, non prevedevano un gruppo di controllo o di paragone e risultano pertanto solo relativamente indicativi.

Al contrario, i programmi di intervento *down-stream* sono gli unici ad aver documentato i maggiori benefici, pertanto la strategia attuale di prevenzione si basa essenzialmente sull'identificazione di individui ad alto rischio con ridotta tolleranza al glucosio (IGT) o

alterata glicemia a digiuno (IFG) ed è appropriata in comunità di rischio genetico da basso a moderato in cui la maggioranza della popolazione non svilupperà la malattia.

In ogni caso alla strategia di screening deve essere associato un preciso programma di *follow-up* dei soggetti a rischio, in grado di monitorare sia la progressione che la regressione.

Prevenzione del diabete

Sebbene lo sviluppo del DM2 dipenda dall'interazione tra fattori genetici e ambientali, gli interventi di prevenzione oggi mirano soprattutto alla correzione dei fattori di rischio acquisiti e modificabili. Gli studi di prevenzione del DM2 svolti di recente hanno valutato l'efficacia sia di interventi sullo stile di vita sia l'impiego di farmaci (Tab. 8); entrambe le tipologie di intervento tendono a ridurre l'insulino-resistenza e a promuovere e sostenere la funzione β -cellulare pancreatica.

L'adozione di un corretto stile di vita, che mira alla riduzione del peso corporeo di almeno il 5%, prevede la pratica regolare di attività fisica aerobica di moderata intensità per almeno 20-30 minuti al giorno (o 150 minuti alla settimana), associata ad abitudini alimentari più corrette. L'intervento farmacologico si basa sull'impiego di farmaci ipoglicemizzanti orali come metformina, tiazolidinedioni, acarbosio, nateglinide oppure sull'impiego di farmaci anti-obesità, come l'orlistat.

Per la prevenzione del DM2, l'ADA (278) attualmente raccomanda di indirizzare i soggetti con IGT, con IFG o con valori di HbA1c fra 5.7-6.4% ad un programma di supporto per la riduzione del peso corporeo (-5-10%) e l'aumento dell'attività fisica (almeno 150 minuti/settimana di attività fisica moderata, come camminare). Inoltre, propone di affiancare la metformina al programma di modifiche dello stile di vita, nei soggetti obesi di età superiore a 60 anni a rischio molto elevato (IFG+IGT+altri fattori di rischio). Suggestisce, in fine, che per il successo di un programma di prevenzione sono fondamentali visite di *follow-up* e che il monitoraggio dello sviluppo di DM2 dovrebbe essere effettuato annualmente.

Tabella 8. Studi di prevenzione del diabete tipo 2 e loro principali caratteristiche.

| Studio | N. | Popolazione | Durata (anni) | Intervento (dose giornaliera) | Riduzione del RR (% - 95%IC) |
|------------------------------|------|---|------------------|--|---------------------------------|
| <u>Stile di vita</u> | | | | | |
| Da Qing (296) | 259 | IGT | 6.0 | Dieta + esercizio fisico | -38 (14-56) |
| Finnish DPS (298) | 522 | IGT BMI ≥ 25 Kg/m ² | 3.2 | Dieta + esercizio fisico | -58 (30-70) |
| DPP (299) | 2161 | IGT FPG >95 mg/dl BMI ≥ 24 Kg/m ² | 3.0 | Dieta + esercizio fisico | -58 (48-66) |
| <u>Terapia farmacologica</u> | | | | | |
| Indian DPP (301) | 269 | IGT | 2.5 | Dieta + esercizio fisico | -29 (21-37) |
| DPP (299) | 2155 | IGT FPG >95 mg/dl BMI ≥ 24 Kg/m ² | 2.8 | Metformina (1700 mg) | -31 (17-43) |
| Indian DPP (301) | 269 | IGT | 2.5 | Metformina (500 mg) | -26 (19-35) |
| DREAM (303) | 5269 | IGT o IFG | 3.0 | Rosiglitazone (8 mg) | -60 (54-65) |
| ACT NOW (304) | 602 | IGT o IFG | 2.6 | Pioglitazone (45 mg) | -81 (61-91) |
| CANOE (305) | 207 | IGT o IFG | 3.9 | Rosiglitazone (4 mg) Metformina (1000 mg) | -66 (41-80) |
| NAVIGATOR (307) | 9306 | IGT + fattori di rischio/malattia CV | 6.5 | Nateglinide (120 mg) | +7 (0-15) |
| STOP-NIDDM (306) | 1419 | IGT FPG >100 mg/dl | 3.2 | Acarbosio (300 mg) | -25 (10-37) |
| XENDOS (309) | 3277 | BMI ≥ 30 Kg/m ² | 4.0 | Orlistat (360 mg) | -37 (14-54) |

Uno dei primi studi a fornire indicazioni sulla prevenzione del DM2 mediante opportune modifiche dello stile di vita è stato lo studio cinese Da Qing (296), effettuato su 577 soggetti con IGT, che ha mostrato, dopo un follow-up di 6 anni, una riduzione di progressione verso il DM2 pari al 42%. Nell'ambito dello studio venivano valutati separatamente o in modo combinato gli effetti di un intervento incisivo ed individuale sull'attività fisica e sulle abitudini alimentari (dieta composta da 10-15% proteine, 55-65% di carboidrati e riduzione dell'introito di grassi al 25-30% delle calorie totali giornaliere), rispetto ad un gruppo di controllo. L'incidenza cumulativa del DM2 dopo 6 anni risultava pari al 67.7% (95% IC, 59.8 - 75.2) nel gruppo di controllo rispetto al 43.8% (95% IC,

35.5 - 52.3) nel gruppo a sola dieta, 41.1% (95% IC, 33.4 - 49.4) nel gruppo attività fisica e 46.0% (95% IC, 37.3 - 54.7) nel gruppo dieta + attività fisica ($p < 0.05$), con relativa riduzione del rischio di sviluppare DM2 (Fig. 21) rispettivamente del 31% ($p < 0.03$), 46% ($p < 0.0005$) e 42% ($p < 0.005$). Recentemente sono stati pubblicati i risultati a lungo termine dello studio Da Qing che hanno documentato il persistere di una più bassa incidenza di DM2 nei soggetti dei tre bracci di intervento sullo stile di vita (HR 0.57; 95%IC: 0.41 – 0.81) anche dopo 20 anni dall'intervento attivo (297).

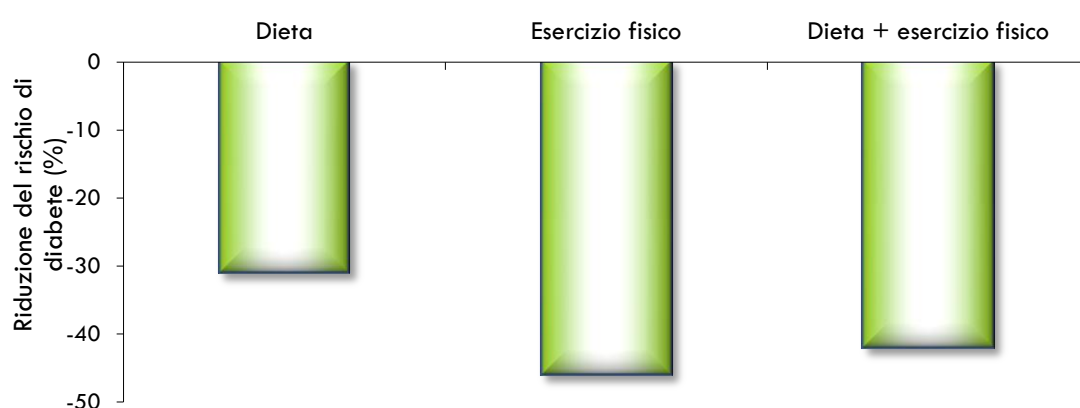


Figura 20. Riduzione del rischio di diabete nello studio DaQing.

Successivamente allo studio cinese, il *Finnish Diabetes Prevention Study* (DPS) (298) ed il *Diabetes Prevention Program* (DPP) (299) hanno confermato l'efficacia del cambiamento dello stile di vita nel prevenire lo sviluppo di DM2. Lo studio DPS ha valutato gli effetti della dieta e dell'esercizio fisico sulla progressione da IGT a diabete in 552 soggetti sovrappeso ($BMI \geq 25 \text{ Kg/m}^2$) con IGT, seguiti per 3,2 anni. I soggetti sono stati randomizzati in due diversi tipi d'intervento sullo stile di vita. Al gruppo di controllo sono state date istruzioni generali sulla dieta e sull'esercizio fisico, mentre al gruppo d'intervento sono stati forniti consigli individualizzati e strutturati volti alla riduzione del peso corporeo, all'alimentazione corretta, allo svolgimento di un'adeguata attività fisica. Dopo 4 anni di intervento, l'incidenza cumulativa del DM2 è stata dell'11% nel gruppo d'intervento e del 23% nel gruppo di controllo, con riduzione del rischio di DM2 pari al 58% (Fig. 22; 298). I dati derivanti dai *follow-up* a lungo termine dello studio DPS documentano che i benefici delle modifiche dello stile di vita e la riduzione del rischio di sviluppare DM2 si mantengono anche dopo l'interruzione dell'intervento attivo, facendo registrare una riduzione del 43% del rischio relativo di DM2 dopo 7 anni di *follow-up* (300).

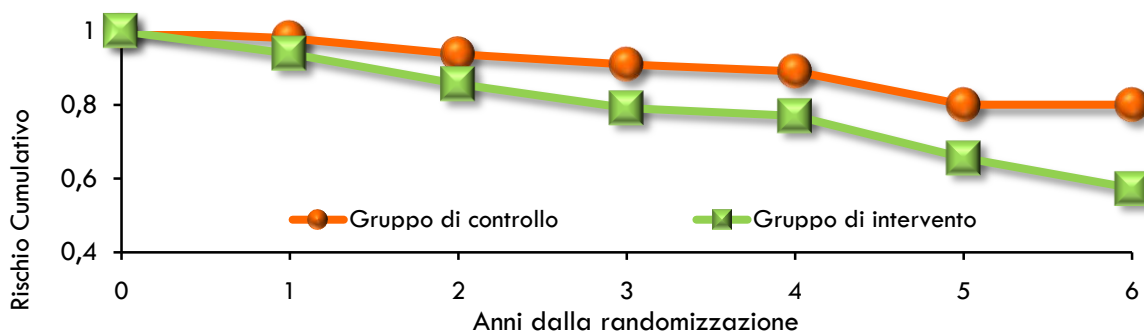


Figura 21. Riduzione del rischio di diabete nello studio DPS.

Nello studio DPP, 3234 individui con IGT o IFG e BMI >24 Kg/m² sono stati seguiti per una media di 3 anni. I soggetti sono stati randomizzati in tre gruppi: placebo, metformina, programma di modifica dello stile di vita (riduzione del peso corporeo ed attività fisica). In questo studio si è osservata una riduzione nel rischio relativo di sviluppare DM2 pari al 58% nel gruppo d'intervento sullo stile di vita in confronto al gruppo trattato con placebo. Nel braccio di intervento farmacologico, la metformina riduceva il rischio relativo di DM2 del 31% rispetto al placebo. Più recentemente, l'uso della metformina è stato valutato anche in uno studio indiano con risultati simili a quelli ottenuti nel DPP (301). È interessante sottolineare che in questo studio la combinazione metformina e modifiche dello stile di vita non era più efficace dei due interventi praticati isolatamente.

Nello studio *Troglitazone in the Prevention of Diabetes mellitus* (TRI-POD), il troglitazone si è rivelato in grado di ridurre l'insorgenza di DM2 del 58% rispetto al placebo in donne ispaniche con precedente storia di GDM (302), sebbene lo studio sia stato terminato precocemente a causa della tossicità epatica del troglitazone. In tempi più recenti gli effetti di questa classe di farmaci sulla prevenzione del DM2 è stata riproposta dallo studio DREAM (*Diabetes REDuction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication*) che ha valutato l'impiego del rosiglitazone in soggetti a rischio. In questo studio sono stati arruolati 5269 soggetti (età >30 anni) con IGT o IFG (303). I soggetti sono stati assegnati al gruppo placebo o al gruppo rosiglitazone. Il farmaco ha ridotto il rischio di sviluppare il DM2 del 60%, in maniera statisticamente significativa rispetto al placebo, e si associa a un tasso di miglioramento del grado di tolleranza glucidica più elevato rispetto al placebo (Fig. 23).

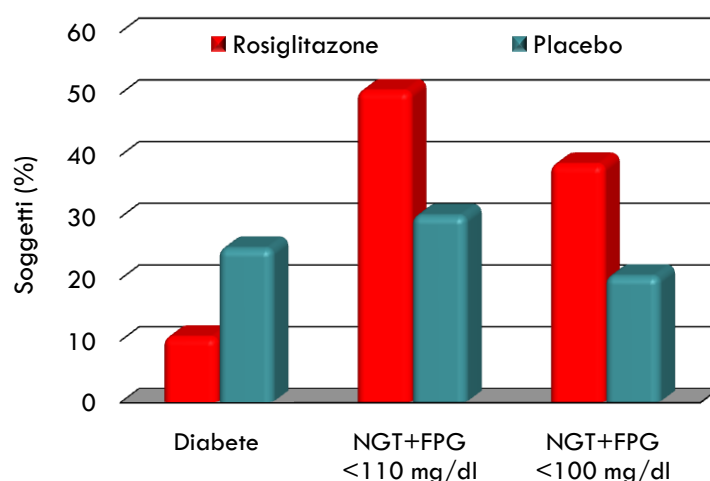


Figura 22. Riduzione del diabete e conversione verso la normo-glicemia nei partecipanti allo studio DREAM.

Lo studio ACT NOW (304) ha valutato in soggetti con IGT l'effetto della somministrazione di pioglitazone (45 mg/die) sulla conversione a DM2 in 4 anni di *follow-up*, riportando una significativa riduzione della conversione a DM2 (-81%) nei soggetti in trattamento attivo. Recentemente, lo studio CANOE (CAⁿadian Normoglycemia Outcomes Evaluation) ha valutato l'uso combinato di bassi dosaggi di rosiglitazone e metformina (2 mg + 500 mg x 2/die, rispettivamente) per la prevenzione del DM2 in 207 soggetti con IGT (305). Dopo 3.9 anni di follow-up, il 14% dei soggetti nel braccio di trattamento attivo sviluppavano DM2 rispetto al 39% di quelli nel braccio di controllo ($p < 0.0001$). La riduzione del rischio relativo era pari al 66% (95%IC: 41-80) e la riduzione del rischio assoluto pari al 26% (95%IC: 14-37), con un NNT di 4 (95%IC: 2.70-7.14).

Altri studi hanno valutato l'effetto di interventi farmacologici mirati alla riduzione della glicemia post-prandiale sulla prevenzione del DM2. Lo studio multicentrico STOP-NIDDM (*Study TO Prevent Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus*), ha valutato in 1429 soggetti con IGT gli effetti del trattamento con acarbiosio (inibitore della α -glicosidasi intestinale) per 3 anni (306). Questo studio ha mostrato una riduzione del rischio relativo di sviluppare DM2 del 25% nel gruppo trattato con acarbiosio rispetto ai soggetti trattati con placebo (Tab. 9). Dopo la fine dello studio, i pazienti sono stati valutati a distanza dalla sospensione del trattamento (farmaco o placebo) di circa 3 mesi, durante i quali il 15% dei pazienti trattati con acarbiosio ha sviluppato DM2 rispetto al 10.5% dei pazienti di controllo. Questo effetto, però, scompare alla sospensione del trattamento.

Tabella 9. Effetti dell'acarbiosio rispetto al placebo sulla tolleranza glucidica nello studio STOP-NIDDM.
* p<0.001

| | NGT | IGT | DM2 |
|--------------------|-------|------|-------|
| Acarbiosio (n=682) | 35.3* | 28.4 | 32.4* |
| Placebo (n=686) | 30.9 | 24.9 | 41.5 |

Recentemente sono stati pubblicati i risultati dello studio NAVIGATOR (*Netaglinide and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research*) che ha valutato l'incidenza di DM2 in 9306 soggetti IGT con pregressa patologia cardiovascolare o fattori di rischio cardiovascolari, randomizzati a ricevere nateglinide (fino a 60 mg x 3/die) o placebo, in un disegno fattoriale 2 x 2 con valsartan o placebo, in associazione ad un programma di modifiche dello stile di vita (307). Tuttavia, dopo un *follow-up* medio di 5 anni, nateglinide non determinava una riduzione significativa dell'incidenza cumulative di DM2 rispetto al placebo (HR 1.07; 95% IC: 1.00-1.15; p=0.05). L'impiego di valsartan per 5 anni si associava, invece, ad una modesta riduzione dell'incidenza del DM2 (HR 0.86; 95% IC: 0.80-0.92; p<0.001) (308).

In fine, lo studio XENDOS (*XENical in the prevention of Diabetes in Obese Subjects*) ha valutato il ruolo dell'orlistat (un inibitore della lipasi gastrica e pancreatica che limita del 30% l'assorbimento dei lipidi introdotti con l'alimentazione) nella prevenzione del DM2 in soggetti obesi (BMI>30 kg/m²), dei quali il 21% con IGT (309). In questo studio il trattamento farmacologico, associato a dieta ed esercizio fisico, da determinato, dopo 4 anni, una riduzione complessiva del 37% del rischio di DM2, che nei soggetti con IGT ha raggiunto il 45% (309).

Sia l'intervento farmacologico che quello sullo stile di vita riducono, quindi, la progressione verso il DM2 nei soggetti con IGT. In una recente meta-analisi di studi sulla prevenzione del DM2 si osserva una *hazard ratio* (HR) complessivo pari a 0.51 (95% IC: 0.44 – 0.60) per le modifiche dello stile di vita e 0.70 (95% IC: 0.62 – 0.79) per l'intervento farmacologico, con un NNT (*Number Needed to Treat*) stimato di 6.4 per l'intervento sullo stile di vita e 10.8 per la terapia farmacologica, con un *follow-up* fra 3 e 6 anni (310).

Recentemente sono stati pubblicati alcuni studi di breve durata che hanno documentato come l'impiego di farmaci basati sulle incretine possano migliorare il peso corporeo nei soggetti obesi con o senza alterazioni della regolazione glucidica e migliorare la loro parametri glicemici. Ad esempio, l'impiego di exenatide vs. modifiche dello stile di vita per

24 settimane in 152 soggetti obesi ($\text{BMI } 39.6 \pm 7.0 \text{ kg/m}^2$), di cui il 25% era IGT o IFG, si è associato ad una netta riduzione del peso corporeo ($-5.1 \pm 0.5 \text{ kg}$ vs. $-1.6 \pm 0.5 \text{ kg}$) e ad un buon tasso di conversione da IFG o IGT a NGT (77% vs. 56%) (311).

Importanti benefici nella riduzione del peso corporeo e nella regressione a NGT si sono osservati anche nello studio di 20 settimane che ha confrontato l'uso di liraglutide vs. orlistat o placebo in 564 soggetti obesi ($\text{BMI } 30\text{-}40 \text{ Kg/m}^2$) (312). La riduzione del peso corporeo è stata maggiore e dose-dipendente nei bracci di trattamento con liraglutide rispetto ad orlistat o placebo (-4.8 kg con liraglutide 1.2 mg , -5.5 kg con 1.8 mg , -6.3 kg con 2.4 mg e -7.2 kg con 3.0 mg vs. -4.1 kg con orlistat e -2.8 kg con placebo) ed il 76% dei soggetti trattati con liraglutide ha perso almeno il 5% del peso (vs. 44% con orlistat). Inoltre, la prevalenza di disglicemia si è ridotta dell'84–96% con liraglutide da 1.8 mg a 3.0 mg , con un OR stimato fra 4 e 38 per liraglutide vs. 1.5 per orlistat o placebo (312).

Chiaramente non si tratta di studi strutturati per la prevenzione del DM2, ma i risultati sembrano essere incoraggianti e lasciano aperte nuove strade per future applicazioni di questi farmaci anche nell'ambito della prevenzione del DM2.

Merita anche un cenno l'impiego della chirurgia bariatrica nel trattamento dell'obesità ed il suo potenziale ruolo nella prevenzione del DM2. Alcuni studi hanno valutato l'efficacia di interventi di chirurgia bariatrica rispetto alla dieta ipocalorica nel prevenire l'insorgenza di DM2 in soggetti affetti da obesità di grado severo ($\text{BMI} > 40 \text{ Kg/m}^2$) e IGT, dimostrando una riduzione significativa dell'incidenza di DM2, in associazione a una riduzione del BMI, nei soggetti sottoposti a intervento chirurgico rispetto al gruppo di controllo trattato in maniera convenzionale (313-315).

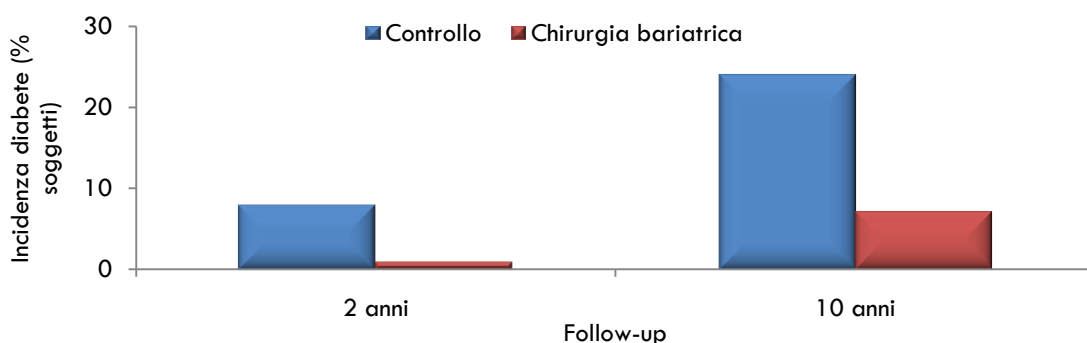


Figura 23. Incidenza di diabete tipo 2 nello studio SOS (*Swedish Obese Subjects Study*) che ha valutato gli effetti della chirurgia bariatrica rispetto alla dieta ipocalorica in 4047 soggetti obesi con follow-up a 2 anni e in 1703 con follow-up a 10 anni.

In fine, anche alcuni farmaci non propriamente legati al trattamento del DM2 e dell'obesità, come le statine e alcune classi di farmaci antiipertensivi (ACE-Inibitori), hanno dimostrato di avere un effetto protettivo verso lo sviluppo di DM2. Nello studio WOSCOPS (*West Of Scotland Coronary Prevention Study*), ad esempio, si è osservata una riduzione dell'incidenza di DM2 del 30% nei soggetti trattati con prava statina (316), suggerendo importanti effetti pleiotropici: riduzione delle citochine infiammatorie (IL-6, TNF- α) coinvolte nella genesi dell'insulino-resistenza, miglioramento della funzione endoteliale con incremento della perfusione muscolare e adiposa e aumento dell'*uptake* e dell'utilizzo di glucosio. In realtà, altri studi con statine, come HPS (*Heart Protection Study*) con simvastatina (317), ASCOT-LLA (*Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial - Lipid Lowering Arm*) con atorvastatina (318) e LIPID (*Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease*) con la prava statina (319), non hanno confermato quanto osservato nello studio WOSCOPS. Una recente meta-analisi (320) di studi controllati con statine non ha evidenziato alcun beneficio delle statine nella prevenzione del DM2.

In letteratura oltre 200 studi riportano un potenziale effetto protettivo di farmaci antiipertensivi sull'incidenza di nuovi casi di DM2, ma dall'analisi dei soli 14 trial randomizzati e controllati (nessuno dei quali aveva l'incidenza del DM2 come *end-point* primario), non sembrano emergere dati sufficientemente convincenti che dimostrino chiaramente che l'uso di alcune classi di farmaci antiipertensivi sia utile per prevenire la comparsa di DM2 nei soggetti a rischio (321). Nel recente studio DREAM, finalizzato a valutare gli effetti di rosiglitazone e/o ramipril sulla prevenzione di DM2, i risultati ottenuti con l'ACE-Inibitore sono stati inferiori a quelli riportati con rosiglitazone (322). Nel gruppo in trattamento con ramipril, infatti, non si osservava una riduzione significativa dell'incidenza di DM2 rispetto al placebo (18.1% vs. 19.5%; HR 0.91; 95%IC 0.81-1.03; $p=0.15$). Tuttavia, il ramipril si associava ad una maggior regressione a normoglicemia, *end-point* secondario dello studio (HR 1.16; 95%IC 1.07-1.27; $p=0.001$). E' pertanto possibile ipotizzare che, diversamente da quanto succede con diuretici e β -bloccanti non selettivi, che anche in studi di popolazione molto ampi hanno confermato un modesto effetto peggiorativo sull'equilibrio glucidico, ACE-inibitori e inibitori del recettore dell'angiotensina II abbiano un effetto favorevole sul metabolismo glucidico (Tab. 10).

Tabella 10. Effetto dei farmaci anti-ipertensivi sullo sviluppo di diabete tipo 2 in studi randomizzati e controllati.

| Studio | Numero e caratteristiche dei pazienti | Farmaco | Incidenza diabete |
|----------------|---|--|---------------------|
| CHARM | 5434 con scompenso cardiaco | Candesartan vs. placebo | - 22% |
| EWPHE | 840 con ipertensione | Triamterene + Idroclorotiazide \pm Metildopa vs. placebo | + 50% |
| HOPE | 5720 ad elevato rischio CV | Ramipril vs. placebo | - 34% |
| SCOPE | 4342 con ipertensione (70-89 anni) | Candesartan vs. placebo | - 19% |
| SHEP | 4153 con ipertensione sistolica | Clortalidone + Atenololo vs. placebo | + 20% |
| SOLVD (Canada) | 311 con disfunzione ventricolare sinistra | Enalapril vs. placebo | - 74% |
| ALLHAT | 14816 ad elevato rischio CV | Amlodipina vs. Clortalidone Lisinopril vs. Clortalidone | - 20% - 30% |
| ALPINE | 392 con ipertensione | Candesartan \pm Felodipina vs. Idroclorotiazide \pm Atenololo | - 87% |
| CAPP | 10413 con ipertensione | Captopril vs. β -bloccanti/Tiazidici | - 14% |
| HAPPY | 6569 con ipertensione (40-64 anni) | Tiazidici vs. β -bloccanti | - 12% |
| INSIGHT | 5019 con ipertensione e 1 fattore di rischio CV | Nifedipina vs. Idroclorotiazide/Amiloride | - 23% |
| LIFE | 7998 con ipertrofia ventricolare sinistra | Losartan vs. Atenololo | - 25% |
| NORDIL | 10154 con ipertensione (50-69 anni) | Diltiazem vs. Diuretici | - 13% |
| STOP-2 | 5893 con ipertensione (70-84 anni) | ACE- inibitori vs. Diuretici/ β -bloccanti Calcio-antagonisti vs. Diuretici/ β -bloccanti ACE-inibitori vs. Calcio-antagonisti | - 4% - 3% -4% |
| VALUE | 15245 con ipertensione (> 50 anni) | Valsartan vs. Amlodipina | + 4% |

Gli studi finora esaminati confermano la possibilità di incidere in modo significativo sull'evoluzione del DM2 e sui fattori di rischio ad esso associati, nei soggetti ad alto rischio, come ad esempio gli individui con alterata regolazione glucidica. Allo stesso tempo, suggeriscono che con buona probabilità l'intervento preventivo possa essere tanto più efficace se ai programmi di modifica dello stile di vita si associano trattamenti farmacologici efficaci e sicuri. Rimane da determinare se il risultato sarebbe simile in altri gruppi di rischio per DM2, ma è ragionevole ipotizzare che gli interventi proposti siano efficaci anche per altre categorie a rischio di DM2 (ad esempio soggetti con IFG, obesità, familiarità per DM2, ecc.). Tuttavia, per il momento non sono disponibili dati che permettano di valutare il bilancio costo-beneficio dell'implementazione di programmi di prevenzione in categorie diverse dall'IGT. Una migliore identificazione degli individui ad alto rischio e di coloro che tra questi sono maggiormente suscettibili a sviluppare la malattia, potrebbe aiutare a convogliare energie e risorse per una prevenzione più efficace.

Sebbene i risultati degli studi clinici di prevenzione del DM2 siano incoraggianti, la loro trasferibilità nel “mondo reale” appare una vera sfida. Tuttavia, in alcune comunità sono stati effettuati programmi di prevenzione sulla base degli studi clinici, seppur in modo meno intensivo e meno costoso, ottenendo discreti risultati. Ad esempio, in Finlandia, lo studio GOAL (*GOod Ageing in Lahti region*) (323) ha reclutato 352 soggetti di mezza età di ambo i sessi ad alto rischio di DM2, screeniati mediante FINDRISC, e sono stati successivamente inseriti in un programma di prevenzione del DM2 mediante modifiche dello stile di vita basato sul DPS (298). Dopo 6 incontri di gruppo nel corso di un anno, il 20% dei partecipanti ha raggiunto almeno 4 dei 5 obiettivi di modifica dello stile di vita, con un significativo miglioramento dei parametri clinici ed una riduzione del rischio di DM2. Tuttavia, gli obiettivi relativi all'attività fisica e alla riduzione del peso corporeo sono stati raggiunti meno frequentemente rispetto al DPS, studio di riferimento, suggerendo che l'intensità del trattamento dovrebbe essere aumentata. Un approccio simile è stato impiegato anche nel progetto DEPLOY (*Diabetes Education & Prevention with a Lifestyle intervention Offered at the YMCA*) (324), basato sull'applicazione dello studio americano DPP. Sono stati inseriti nello studio soggetti con BMI ≥ 24 Kg/m² o con 2 o più fattori di rischio per il DM2 ed una glicemia capillare random compresa fra 110 mg/dl e 200 mg/dl. Dopo un anno di periodici incontri di gruppo volti a costruire conoscenze e capacità relative al raggiungimento degli obiettivi, auto-monitoraggio e *problem-solving*, si osservava nel gruppo di intervento una significativa riduzione del peso corporeo rispetto ai soggetti di controllo (-6% vs. -1.8%; $p=0.008$). Iniziative simili sono state implementate anche in Australia (*Greater Green Triangle Diabetes Prevention Program*) (325).

Questi studi pilota sono stati la base per l'implementazione di progetti di più ampia scala, attualmente in corso in diversi paesi europei, che cercano di agire a livello di popolazione. In Finlandia, ad esempio, è in corso il progetto DEHKO (326), uno programma di prevenzione del DM2 che mira ad implementare l'adozione di un'alimentazione sana ed una regolare attività fisica nell'intera popolazione nazionale e prevede strategie individuali di intervento nei soggetti ad alto rischio e programmi per la diagnosi precoce del DM2. Il progetto DE-PLAN (*Diabetes in Europe – Prevention using Lifestyle, Physical Activity and Nutritional Intervention*) (327) si propone, invece, di prevenire il diabete mediante modifiche dello stile di vita nei soggetti a rischio individuati mediante FINDRISC a livello di comunità in 17 paesi europei. Recentemente è stato introdotto in UK il programma Change4Life (www.nhs.uk/Change4Life) che mira a prevenire il sovrappeso e l'obesità ed incoraggia la popolazione a mangiare meglio e muoversi di più.

Al fine di migliorare la possibilità di successo dell'intervento preventivo sarà, quindi, necessario tracciare strategie che risultino particolarmente aggressive nei confronti dei gruppi ad alto rischio di sviluppare DM2, ma devono anche essere dirette all'intera comunità in tema di educazione sanitaria. E' necessario far crescere la consapevolezza dell'importanza di seguire un corretto stile di vita e diffondere la conoscenza dei rischi connessi a patologie degenerative come il DM2 e l'obesità. Interventi finalizzati alla modifica dello stile di vita devono avvenire precocemente, a partire dall'età scolare, dato che è in questa fascia d'età che si possono ottenere le maggiori possibilità di successo, in quanto sempre più difficile e meno fruttuoso risulta un intervento tardivo, effettuato in età adulta. Vi è, pertanto, un urgente bisogno che la scuola introduca programmi strutturati e formali su nutrizione e attività fisica come strumenti di benessere. Non trascurabile, infine, è l'opportunità di utilizzare i media per mettere in atto una campagna esplicita a favore di una corretta alimentazione e di una regolare attività fisica e diffondere messaggi diretti sulle tragiche conseguenze del DM2 e dell'obesità al fine di sensibilizzare la popolazione su tali tematiche.

Riduzione del rischio cardiovascolare nei soggetti con disglycemia

Numerosi studi hanno dimostrato che già prima dell'insorgenza del DM2 il rischio di mortalità cardiovascolare è aumentato (257). La comparsa di malattia cardiovascolare prima dell'insorgenza clinica del DM2 sostiene l'ipotesi che una strategia di prevenzione del DM2 nei soggetti ad alto rischio possa associarsi ad una riduzione del rischio cardiovascolare. Nello studio finlandese di prevenzione del DM2 (298), gli interventi basati sul cambiamento della dieta e sull'esercizio fisico, in soggetti con IGT, si associavano non solo alla riduzione dell'incidenza di DM2, ma anche al miglioramento di numerosi fattori di rischio cardiovascolare. Infatti, al termine del periodo di *follow-up*, i livelli di pressione arteriosa sistolica e diastolica, trigliceridi e insulina erano significativamente più bassi nel gruppo di intervento rispetto ai controlli. Anche i risultati dello studio DPP vanno nella stessa direzione. Sia l'incidenza di ipertensione che la dislipidemia aterogena si riducevano con l'intervento sullo stile di vita, mentre l'impiego di farmaci per il raggiungimento degli obiettivi terapeutici per l'ipertensione e l'iperlipidemia risultava più basso del 27% e 25% rispetto al gruppo trattato con metformina. Si assisteva, inoltre, ad una riduzione dei livelli di PCR, attribuibile soprattutto alla riduzione del peso, più che all'aumento di attività fisica (328). Non solo, ma i fattori di rischio cardiovascolare, ad eccezione del colesterolo LDL, tendevano a migliorare con il miglioramento della regolazione glicemica verso la classe di normo-tolleranza. Infine, si osservava una riduzione dell'incidenza di SM nei soggetti del gruppo di intervento sullo stile di vita (329). Quindi, un trattamento precoce basato su modificazioni dello stile di vita e, in misura, minore sull'uso di metformina in soggetti ad elevato rischio di DM2 è in grado di migliorare simultaneamente la tolleranza glicemica ed il rischio cardiovascolare (330). Per alcuni degli studi di prevenzione del DM2 sono stati pubblicati di recente anche i dati di morbidità e mortalità cardiovascolare. Nel DPS, dopo 10 anni di *follow-up*, l'intervento sullo stile di vita non si accompagnava a riduzione della morbidità cardiovascolare, e il più basso tasso di mortalità osservata tra i partecipanti allo studio rispetto a quello dei soggetti IGT della popolazione generale potrebbe essere attribuita al miglior profilo di rischio cardiovascolare presente fin dall'inizio dello studio ed al *follow-up* (331). Anche nello studio Da Qing (297) il numero di eventi non differiva tra il gruppo di intervento e i controlli (HRR 0.98%; 95% CI 0.71-1.37), così come la mortalità per cause cardiovascolari (0.83; 0.48-1.40) e per tutte le cause (0.96; 0.65-1.41).

Nello studio DREAM, la terapia con rosiglitazone in soggetti con IGT determinava oltre ad una minor progressione a DM2, anche una significativa riduzione dei livelli pressori, mentre per gli eventi cardiovascolari non si registrava alcun beneficio ed emergeva, invece, un incremento dei casi di scompenso cardiaco (303). Si osservava, tuttavia, una modesta riduzione della progressione dell'ispessimento intima-media carotideo nel gruppo in trattamento con rosiglitazone (332).

Occorre considerare, comunque, che gli studi citati non essendo stati disegnati per valutare gli eventi cardiovascolari hanno un basso potere statistico legato al basso numero di eventi registrati.

Riguardo alla possibilità di intervento sulla glicemia post-prandiale, lo studio STOP-NIDDM con acarbosio, ha dimostrato non solo una riduzione della conversione a DM2, ma anche degli eventi cardiovascolari del 49%, e del 91% dell'infarto miocardico, così come una riduzione di incidenza di ipertensione del 34% (306). Un'ipotesi simile è stata testata nello studio NAVIGATOR (307), ottenendo, però, risultati deludenti. Infatti, dopo aggiustamento per fattori confondenti, nateglinide, rispetto al placebo, non riduceva in maniera significativa l'end-point composito cardiovascolare (HR 0.94, 95% IC, 0.82-1.09; $p = 0.43$). Ancora in corso è, invece, lo studio ORIGIN che valuterà se il controllo della glicemia a digiuno con insulina si associa ad un minor rischio cardiovascolare (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00069784>).

Sulla base delle evidenze attualmente a disposizione e in relazione alla frequente aggregazione di altri fattori di rischio cardiovascolare con gli stati di alterata regolazione glicemica, nei soggetti a rischio di DM2, tutte le misure finalizzate a ridurre la progressione o che favoriscono la regressione verso la normoglicemia devono far parte di una strategia globale di prevenzione cardiovascolare che deve prevedere, ovviamente, anche il controllo degli altri fattori di rischio.

Bibliografia

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2010; 87: 4-14
2. Bruno G, Merletti F, Barbero G, Melis D, Masi I, Ianni A, Novelli G, Pagano G, Cavallo-Perin P. Changes over time in the prevalence and quality of care of type 2 diabetes in Italy: the Casale Monferrato Surveys, 1988 and 2000. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:39-45
3. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Meigs JB, Bonadonna RC, Muggeo M; Bruneck study. Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in white individuals: the Bruneck study. *Diabetes* 2004;53:1782-9
4. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999; 22: 920-924
5. Galassi A, Reynolds K, He J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med* 2006; 119: 812-819
6. Massi-Benedetti M, CODE-2 advisory board. The cost of diabetes type II in Europe: the CODE-2 study. *Diabetologia* 2002; 45: S1-S4
7. DECODE Study Group; European Diabetes Epidemiology Group. Age, body mass index and glucose tolerance in 11 European population-based surveys. *Diabet Med* 2002; 19(7): 558-565
8. Cali AM, Caprio S. Prediabetes and type 2 diabetes in youth: an emerging epidemic disease? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15: 123-127
9. Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 1981; 20: 87-93
10. Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (noninsulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance – a population-based twin study. *Diabetologia* 1999; 42: 139-145
11. Thomas F, Balkau B, Vauzelle-Kervroedan F, Papoz L. Maternal effect and familial aggregation in NIDDM. The CODIAB Study. CODIAB-INSERMZENECA Study Group. *Diabetes* 1994; 43: 63-67
12. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, Nilsson P, Groop L. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359: 2220-2232
13. 30 Davis TM. Ethnic diversity in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2008; 25 (Suppl. 2): 52-56
14. Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004; 21: 103-113
15. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009; 373: 1773-1779
16. Dabadghao P, Roberts BJ, Wang J, Davies MJ, Norman RJ. Glucose tolerance abnormalities in Australian women with polycystic ovary syndrome. *Med J Aust* 2007; 187: 328-331
17. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 1999; 22: 141-146
18. Dunaif A. Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98: 33S-39S

19. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 673–683
20. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173–194
21. Vazquez G, Duval S, Jacobs Jr DR, Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiol Rev* 2007; 29: 115–128
22. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 2001; 345(11): 790–797
23. Hu FB, Li TY, Colditz GA, Willett WC, Manson JE. Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA* 2003; 289(14): 1785–1791
24. Valdez R, AthensMA, Thompson GH, Bradshaw BS, SternMP. Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* 1994; 37: 624–631
25. Dyck RF, Klomp H, Tan L. From “thrifty genotype” to “hefty fetal phenotype”: the relationship between high birthweight and diabetes in Saskatchewan Registered Indians. *Can J Public Health* 2001; 92: 340–344
26. Harder T, Rodekamp E, Schellong K, Dudenhausen JW, Plagemann A. Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 849–857
27. Hofman PL, Regan F, Jackson WE, Jefferies C, Knight DB, Robinson EM, Cutfield WS. Premature birth and later insulin resistance. *N Engl J Med* 2004; 351: 2179–2186
28. Kim SH, Chunawala L, Linde R, Reaven GM. Comparison of the 1997 and 2003 American Diabetes Association classification of impaired fasting glucose: impact on prevalence of impaired fasting glucose, coronary heart disease risk factors, and coronary heart disease in a community-based medical practice. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 293–297
29. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539–553
30. Gerstein HC, Santaguida P, Raina P, Morrison KM, Balion C, Hunt D, Yazdi H, Booker L. Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 78: 305–312
31. de Vegt F, Dekker JM, Jager A, Hienkens E, Kostense PJ, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, Heine RJ. Relation of impaired fasting and postload glucose with incident type 2 diabetes in a Dutch population: The Hoorn Study. *JAMA* 2001; 285: 2109–2113
32. Shaw JE, Zimmet PZ, de Courten M, Dowse GK, Chitson P, Gareeboo H, Hemraj F, Fareed D, Tuomilehto J, Alberti KG. Impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. What best predicts future diabetes in Mauritius? *Diabetes Care* 1999; 22: 399–402
33. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486–2497
34. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059–1062
35. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National

Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640-1645

36. Ford ES, Li C, Sattar N. Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care* 2008; 31: 1898–1904
37. Luna B, Feinglos MN. Drug-induced hyperglycemia. *JAMA* 2001; 286: 1945–1948
38. Lindstrom J, Peltonen M, Eriksson JG, Louheranta A, Fogelholm M, Uusitupa M, Tuomilehto J. High-fibre, low-fat diet predicts long-term weight loss and decreased type 2 diabetes risk: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia* 2006; 49: 912–920
39. Salmeron J, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Spiegelman D, Jenkins DJ, Stampfer MJ, Wing AL, Willett WC. Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* 1997; 20: 545–550
40. Salmeron J, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Wing AL, Willett WC. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *JAMA* 1997; 277: 472–477
41. Barclay AW, Petocz P, McMillan-Price J, Flood VM, Prvan T, Mitchell P, Brand-Miller JC. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk – a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 627–637
42. Thanopoulou AC, Karamanos BG, Angelico FV, Assaad-Khalil SH, Barbato AF, Del Ben MP, Djordjevic PB, Dimitrijevic-Sreckovic VS, Gallotti CA, Katsilambros NL, Migdalis IN, Mrabet MM, Petkova MK, Roussi DP, Tenconi MT. Dietary fat intake as risk factor for the development of diabetes: multinational, multicenter study of the Mediterranean Group for the Study of Diabetes (MGSD). *Diabetes Care* 2003; 26: 302–307
43. Salmeron J, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Willett WC. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1019–1026
44. Due A, Larsen TM, Hermansen K, Stender S, Holst JJ, Toubro S, Martinussen T, Astrup A. Comparison of the effects on insulin resistance and glucose tolerance of 6-mo high-monounsaturated-fat, low-fat, and control diets. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 855–862
45. van Woudenberg GJ, van Ballegooijen AJ, Kuijsten A, Sijbrands EJ, van Rooij FJ, Geleijnse JM, Hofman A, Witteman JC, Feskens EJ. Eating fish and risk of type 2 diabetes: A population-based, prospective follow-up study. *Diabetes Care* 2009; 32: 2021–2026
46. Conigrave KM, Hu BF, Camargo Jr CA, Stampfer MJ, Willett WC, Rimm EB. A prospective study of drinking patterns in relation to risk of type 2 diabetes among men. *Diabetes* 2001; 50: 2390–2395
47. Ford ES, Mokdad AH. Fruit and vegetable consumption and diabetes mellitus incidence among U.S. adults. *Prev Med* 2001; 32: 33–39
48. Jiang R, Manson JE, Stampfer MJ, Liu S, Willett WC, Hu FB. Nut and peanut butter consumption and risk of type 2 diabetes in women. *JAMA* 2002; 288: 2554–2560
49. Smith B, Wingard DL, Smith TC, Kritiz-Silverstein D, Barrett-Connor E. Does coffee consumption reduce the risk of type 2 diabetes in individuals with impaired glucose? *Diabetes Care* 2006; 29: 2385–2390
50. Handy SL, Boarnet MG, Ewing R, Killingsworth RE. How the built environment affects physical activity: Views from urban planning. *Am J Prev Med* 2002; 23:64-73
51. Saelens BE, Sallis JF, Frank LD. Environmental correlates of walking and cycling: findings from the transportation, urban design, and planning literatures. *Ann Behav Med* 2003;25:80– 91

52. Gorely T, Marshall SJ, Biddle SJH. Couch kids: Correlates of television viewing among youth. *Int J Behav Med* 2004; 11:152-63
53. French SA, Story M, Jeffrey RW. Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health* 2001; 22:309-35
54. Schluter G, Lee C. Changing food consumption patterns: their effects on the US food system, 1972-92. *Food Rev* 1999;22:35-7
55. French SA. Pricing effects on food choices. *J Nutr* 2003; 133:841S-3S
56. Drewnoski A. Fat and sugar: an economic analysis. *J Nutr* 2003; 133: 838S-40S
57. French SA, Lin, BH, Guthrie, JF. National trend in soft drink consumption among children and adolescents age 6 to 17 years: Prevalence, amounts, and sources, 1977/1978 to 1994/1998. *J Am Diet Assoc* 2003; 103:1326-31
58. Bowman SA, Gortmaker SL, Ebbeling CB, et al. Effects of fast-food consumption on energy intake and diet quality among children in a national household survey. *Pediatrics* 2004;113:112-8
59. French SA, Story M, Neumark-Sztainer D, et al. Fast food restaurant use among adolescents: Associations with nutrient intake, food choices and behavioral and psychosocial variables. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1823-33
60. Jahns L, Siega-Riz AM, Popkin BM. The increasing prevalence of snacking among US children from 1977 to 1996. *J Pediatr* 2001;138:493-8
61. Nielson SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM. Trends in food locations and sources among adolescents and young adults. *Prev Med* 2002;35:107-13
62. Lin BH, Guthrie JF, Frazao E. Nutrient contribution of food away from home. In: Frazao E, ed. *America's eating habits: changes and consequences*. Washington, DC: US Department of Agriculture, 1999:213-42
63. Thompson OM, Ballew C, Resnicow K, Must A, Bandini LG, Cyr H, et al. Food purchased away from home as a predictor of change in BMI z-scores among girls. *Int J Obes* 2004;28:282- 9
64. McCrory M, Fuss P, Hays N, Vinken A, Greenberg A, Roberts S. Overeating in America: association between restaurant food consumption and body fatness in healthy men and women ages 19 to 80. *Obes Res* 1999;7:564- 71
65. Satia JA, Galanko J, Siega-Riz AM. Eating at fast-food restaurants is associated with dietary intake, demographic, psychosocial and behavioural factors among African Americans in North Carolina. *Pub Health Nutr* 2004;7:1089- 96
66. Haines PS, Hungerford DW, Popkin BM, Guilkey DK. Eating patterns and energy and nutrient intakes of US women. *J Am Diet Assoc* 1992;92:698- 704
67. French S, Harnack L, Jeffery R. Fast food restaurant use among women in the Pound of Prevention Study: dietary, behavioral and demographic correlates. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:1353-9
68. Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slattery ML, Jacobs DR Jr, Ludwig DS. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet* 2005; 365: 36-42
69. Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 801-809
70. Fagard RH, Nilsson PM. Smoking and diabetes – The double health hazard! *Prim Care Diabetes* 2009; 3 (4): 205-209
71. Jones OA, Maguire ML, Griffin JL. Environmental pollution and diabetes: a neglected association. *Lancet* 2008; 371: 287-288

72. Lee DH, Lee IK, Song K, Steffes M, Toscano W, Baker BA, Jacobs Jr DR. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* 2006; 29: 1638–1644
73. Knol MJ, Twisk JW, Beekman AT, Heine RJ, Snoek FJ, Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A metaanalysis. *Diabetologia* 2006; 49: 837–845
74. Demakakos P, Pierce MB, Hardy R. Depressive symptoms and risk of type 2 diabetes in a national sample of middle-aged and older adults: the English longitudinal study of aging. *Diabetes Care* 2010; 33(4): 792–797
75. Brancati FL, Whelton PK, Kuller LH, Klag MJ. Diabetes mellitus, race, and socioeconomic status. A population-based study. *Ann Epidemiol* 1996; 6: 67–73
76. Connolly V, Unwin N, Sherriff P, Bilous R, Kelly W. Diabetes prevalence and socioeconomic status: a population based study showing increased prevalence of type 2 diabetes mellitus in deprived areas. *J Epidemiol Community Health* 2000; 54: 173–177
77. Brunner E, Shipley MJ, Blane D, Smith GD, Marmot MG. When does cardiovascular risk start? Past and present socioeconomic circumstances and risk factors in adulthood. *J Epidemiol Community Health* 1999; 53: 757–764
78. Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res.* 2007; 39(10): 707–709
79. Sjöholm A, Nyström T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 4–10
80. Haffner SM. Pre-diabetes, insulin resistance, inflammation and CVD risk. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 61 (Suppl 1): S9–S18
81. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracey RP, Heiss G, for the ARIC Investigators: Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999; 353:1649–1652
82. Festa A, D’Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102: 42–47
83. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 972–978
84. Forouhi NG, Sattar N, McKeigue PM. Relation of C-reactive protein to body fat distribution and features of the metabolic syndrome in Europeans and South Asians. *Int J Obes* 2001; 25:1324–1328
85. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286:327–334
86. Sattar N, Scherbakova O, Ford I et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004; 53: 2855–60
87. Laaksonen DE, Niskanen L, Nyyssonen K et al. C-reactive protein and the development of the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetologia* 2004; 47: 1403–10
88. Doi Y, Kiyohara Y, Kubo M et al. Elevated C-reactive protein and the development of diabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Diabetes Care* 2005; 28: 2497–500
89. Meigs JB, Hu FB, Rifai N et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004; 291: 2529–35

90. Festa A, D'Agostino R, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes mellitus: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes* 2002; 51:1131-1137
91. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G, for the ARIC Investigators: Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999; 353 :1649 –1652
92. Festa A, D'Agostino R Jr, Mykkanen L, Tracy RP, Zaccaro DJ, Hales CN, Haffner SM. Relative contribution of insulin and its precursors to fibrinogen and PAI-1 in a large population with different states of glucose tolerance. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 562 –568
93. Juhan-Vague I, Thompson SG, Jespersen J. Involvement of the hemostatic system in the insulin resistance syndrome: a study of 1500 patients with angina pectoris. *Arterioscler Thromb* 1993;13: 1865 –1873
94. Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PWF. Hyperinsulinemia, hyperglycemia and impaired hemostasis. The Framingham Study. *JAMA* 2000; 283: 221-228
95. Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 264-280
96. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al. Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930–1935
97. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J: Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360: 57–58
98. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2004; 53: 2473– 2478
99. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Coronary artery disease. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 85–89
100. Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Tominaga M, Kato T; Funagata study. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care* 2003; 26: 2015-2020
101. Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2003; 26: 3226–3229
102. Snijder MB, Heine RJ, Seidell JC, Bouter LM, Stehouwer CD, Nijpels G, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Dekker JM. Associations of adiponectin levels with incident impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in older men and women: the hoorn study. *Diabetes Care* 2006; 29: 2498-2503
103. Koenig W, Khuseynova N, Baumert J, Meisinger C, Lowel H. Serum concentrations of adiponectin and risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease in apparently healthy middle-aged men: results from the 18-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1369-1377
104. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *JBiol Chem* 2003; 278:13740–13746
105. Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24: 278–301
106. Rask-Madsen C, Dominguez H, Ihlemann N, Hermann T, Kober L, Torp-Pedersen C. Tumor necrosis factor alpha inhibits insulin's stimulating effect on glucose uptake and endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 2003; 108:1815–1821

107. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:1136–1143
108. Duckworth WC, Hamel FG, Peavy DE. Hepatic metabolism of insulin. *Am J Med* 1988; 85:71–76
109. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 (Suppl.): S186–S190
110. Skinner HA, Holt S, Schuller R, Roy J, Israel Y. Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. *Ann Intern Med* 1984; 101: 847–851
111. Goto T, Onuma T, Takebe K, Kral JG. The influence of fatty liver on insulin clearance and insulin resistance in non-diabetic Japanese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19: 841–845
112. Ohlson LO, Larsson B, Bjorntorp P, Eriksson H, Svardsudd K, Welin L, Tibblin G, Wilhelmsen L. Risk factors for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: thirteen and one-half years of follow-up of the participants in a study of Swedish men born in 1913. *Diabetologia* 1988; 31: 798–805
113. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1889–95
114. Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, Kiefe CI, Roseman J, Lewis CE, Steffes M: Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003; 49: 1358–1366
115. Lee DH, Ha MH, Kim JH, Christiani DC, Gross MD, Steffes M, Blomhoff R, Jacobs DR Jr: Gamma-glutamyltransferase and diabetes—a 4 year follow-up study. *Diabetologia* 2003; 46: 359–364
116. Sattar N, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Stanley A, Forrest E, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J; west of Scotland coronary prevention study. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004; 53: 2855–2860
117. Kim DJ, Noh JH, Cho NH et al. Serum γ -glutamyltransferase within its normal concentration range is related to the presence of diabetes and cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 2005; 22: 1134–1140
118. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844–1850
119. Yokoyama H, Hirose H, Moriya S, Saito I. Significant correlation between insulin resistance and serum γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activity in non-drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 91S–94S
120. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum γ -Glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004; 27: 1427–1432
121. Lee DH, Jacobs Jr DR, Gross M et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003; 49:1358–1366
122. Andre P, Balkau B, Born C, Royer B, Wilpart E, Charles MA, Eschwege E. Hepatic markers and development of type 2 diabetes in middle aged men and women: a three-year follow-up study. The D.E.S.I.R. Study (Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome). *Diabetes Metab* 2005; 31: 542–50
123. Lim JS, Lee DH, Park JY, Jin SH, Jacobs DR Jr. A strong interaction between serum gamma-glutamyltransferase and obesity on the risk of prevalent type 2 diabetes: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Chem* 2007; 53: 1092–1098
124. Lim JS, Yang JH, Chun BY et al. Is serum gamma-glutamyl transferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1018–1023

125. Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects Ramos B cells from oxidation-induced cell death. *J Biol Chem* 2001; 276: 3798–3804
126. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, Posadas R, Williams K, Haffner SM, Stern MP, Ferrannini E; Mexico City diabetes study. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 2005; 28: 1757–1762
127. Andre P, Balkau B, Born C, Charles MA, Eschwege E; D.E.S.I.R. study group. Three-year increase of gamma-glutamyltransferase level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the D.E.S.I.R. cohort. *Diabetologia* 2006; 49: 2599–2603
128. Vaxillaire M, Froguel P. Genetic basis of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America* 2006; 35: 371–384
129. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 928–933
130. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullink JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumestiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928–933
131. Altshuler D, Hirshhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2000; 26: 76–80.
132. Nielsen E-MD, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glumer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 573–577
133. Florez JC, Burtt N, de Bakker PIW, Almgren P, Tuomi T, Holmkvist J, Gaudet D, Hudson TJ, Schaffner SF, Daly MJ, Hirshhorn JN, Groop L, Altshuler D. Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes* 2004; 53: 1360–1368
134. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic β -cell KATP channel subunits Kir6.2 (KNCJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KNCJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 568–572
135. Winckler W, Weedon MN, Graham RR, McCarroll SA, Purcell S, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Bostrom KB, Walker M, Hitman G, Hattersley AT, McCarthy MI, Ardlie KG, Hirshhorn JN, Daly MJ, Frayling TM, Groop L, Altshuler D. Evaluation of common variants in the six known Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 685–693
136. Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes *Nat Genet* 2007; 39: 977–983
137. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA et al. Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39: 951–953
138. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR γ mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab* 2006; 4: 303–311
139. Triggs-Raine BL, Kirkpatrick RD, Kelly SL, Norquay LD, Cattini PA, Yamagata K, Hanley AJ, Zinman B, Harris SB, Barrett PH et al. HNF-1 α G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes onset in an Oji-Cree community. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4614–4619

140. Weedon MN, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Love-Gregory LD, Permutt MA, Hattersley AT, Frayling TM. Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4 α P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the U.K. population. *Diabetes* 2004; 53: 3002-3006
141. Gloyn AL. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycaemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat* 2003; 22: 353-362
142. Weedon MN, Clark VJ, Qian Y, Ben-Shlomo Y, Timpson N, Ebrahim S, Lawlor DA, Pembrey ME, Ring S, Wilkin TJ et al. A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 991-1001
143. Owen KR, Groves CJ, Hanson RL, Knowler WC, Shuldiner AR, Elbein SC, Mitchell BD, Froguel P, Ng MC, Chan JC et al: Common variation in the LMNA gene (encoding lamin A/C) and type 2 diabetes: association analyses in 9,518 subjects. *Diabetes* 2007; 56: 879-883
144. Cauchi S, Vaxillaire M, Choquet H, Durand E, Duval A, Polak M, Froguel P: No major contribution of TCF7L2 sequence variants to maturity onset of diabetes of the young (MODY) or neonatal diabetes mellitus in French white subjects. *Diabetologia* 2007; 50: 214-216
145. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPAR γ) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR γ missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 270-274
146. Nemoto M, Sasaki T, Deeb SS, Fujimoto WY, Tajima N. Differential effect of PPAR γ 2 variants in the development of type 2 diabetes between native Japanese and Japanese Americans. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 57: 131-137
147. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20: 284-287
148. Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, Froguel P. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K $^{+}$ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* 1998; 41: 1511-1515
149. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350: 1838-1849
150. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2008; 40: 1092-1097
151. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet* 2008; 40: 1098-1102
152. Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, Ercolino T, Scarlato G, Iacoviello L, Vigneri R, Tassi V, Trischitta V. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 1999; 48: 1881-1884
153. Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A, Samson C, Froguel P. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2005; 37: 863-867
154. Abate N, Chandalia M, Satija P, Adams-Huet B, Grundy SM, Sandeep S, Radha V, Deepa R, Mohan V. ENPP1/PC-1 K121Q polymorphism and genetic susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 1207-1213
155. Weedon MN, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. No evidence of association of ENPP1 variants with type 2 diabetes or obesity in a study of 8089 U.K. Caucasians. *Diabetes* 2006; 55: 3175-3179

156. Lyon HN, Florez JC, Bersaglieri T, Saxena R, Winckler W, Almgren P, Lindblad U, Tuomi T, Gaudet D, Zhu X, Cooper R, Ardlie KG, Daly MJ, Altshuler D, Groop L, Hirschhorn JN. Common variants in the ENPP1 gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity. *Diabetes* 2006; 55: 3180-3184
157. Mc Ateer JB, Prudente S, Bacci S, Lyon HN, Hirschhorn JN, Trischitta V, Florez JC. The ENPP1 K121Q polymorphism is associated with type 2 diabetes in European populations: Evidence from an updated meta-analysis in 42042 subjects. *Diabetes* 2008; 57: 1125-1130
158. Franks PW, Rolandsson O, Debenham SL, Fawcett KA, Payne F, Dina C, Froguel P, Mohlke KL, Willer C, Olsson T, Wareham NJ, Hallmans G, Barroso I, Sandhu MS. Replication of the association between variants in WFS1 and risk of type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia* 2008; 51: 458-463
159. Florez CJ, Jablonski KA, McAteer J, Sandhu MS, Wareham NJ, Barroso I, Franks PW, Altshuler D, Knowler WC, for the Diabetes Prevention Program Research G. Testing of diabetes-associated WFS1 polymorphisms in the Diabetes Prevention Program. *Diabetologia* 2008; 51: 451-457
160. Sparso T, Andersen G, Albrechtsen A, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Sandbaek A, Lauritzen T, Wasson J, Permutt MA, Glaser B, Madsbad S, Pedersen O, Hansen T . Impact of polymorphisms in WFS1 on prediabetic phenotypes in a population-based sample of middle-aged people with normal and abnormal glucose regulation. *Diabetologia* 2008; 51(9): 1646-1652
161. Turner MD, Cassell PG, Hitman GA. Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21: 505-514
162. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000; 26:163-175
163. Weedon MN, Schwarz PEH, Horikawa Y, Iwasaki N, Illing T, Holle R, Rathmann W, Selisko T, Shulze J, Owen KR, Evans J, Bosque-Plata L, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Bell GI, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1208-1212
164. Song Y, Niu T, Manson JE, Kwiatkowski DJ, Liu S. Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 208-222
165. Tsuchiya T, Schwarz PEH, Bosque-Plata Ld, Geoffrey Hayes M, Dina C, Froguel P, Wayne Towers G, Fischer S, Temelkova-Kurktschiev T, Rietzsch H. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes in Europeans: Results of pooled and meta-analyses. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; 89: 174-184
166. Carlsson E, Poulsen P, Storgaard H, Almgren P, Ling C, Björn Jensen C, Madsbad S, Groop L, Vaag A, Ridderstråle M. Genetic and non-genetic regulation of CAPN10 mRNA expression skeletal muscle. *Diabetes* 2005; 54: 3015-20
167. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320
168. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-796
169. Marchini J, Donnelly P, Cardon LR. Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat Genet* 2005; 37: 413-417
170. Marchini J, Howie B, Meyer S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet* 2007; 39: 906-913
171. Bird CP, Stranger BE, Dermitzakis ET. Functional variation and evolution of non-coding DNA. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 559-564

172. Gauthier BR, Wollheim CB. MicroRNAs: 'ribo-regulators' of glucose homeostasis. *Nat Med* 2006; 12: 36-38
173. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445: 881-885
174. Diabetes Genetics Initiative (Saxena R, Voigt B, Lyssenko V et al.): Genome wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007; 316: 1331-1336
175. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007; 316: 1336-1341
176. Scott L, Moehlke K, Bonnycastle LL et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007; 316: 1341-1345
177. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2007; 39: 770-775
178. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a β -cell-specific Zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004; 53: 2330-2337
179. Bort R, Martinez-Barbera JP, Beddington RS, Zaret KS. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* 2004; 131: 797-806
180. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy ML. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316: 889-894
181. Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruukonen A, Ebrahim S, Shields B, Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Lango H, Melzer D, Ferrucci L, Paolisso G, Neville MJ, Karpe F, Palmer CN, Morris AD, Elliott P, Jarvelin MR, Smith GD, McCarthy ML, Hattersley AT, Frayling TM. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 2008; 57: 1419-1426
182. Salonen JT, Uimari P, Aalto JM, Pirskanen M, Kaikkonen J, Todorova B, Hypponen J, Korhonen VP, Asikainen J, Devine C, Tuomainen TP, Luedemann J, Nauck J, Kerner W, Stephens RH, New JP, Ollier WE, Gibson JM, Payton A, Horan MA, Pendleton N, Mahoney W, Meyre D, Delplanque J, Froguel P, Luzzatto O, Yakir B, Darvasi A. Type 2 diabetes whole-genome association study in four populations: the DiaGen consortium. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 338-345
183. Hayes MG, Pluzhnikov A, Miyake K, Sun Y, Ng MCY, Roe CA, Below JE, Nicolae RI, Konkashbaev A, Bell GI, Cox NJ, Hanis CL. Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through genome-wide association studies. *Diabetes* 2007; 56: 3033-3044
184. Hanson RL, Bogardus C, Duggan D, Kobes S, Knowlton M, Infante AM, Marovich L, Benitez D, Baier LJ, Knowler WC. A search for variants associated with young-onset type 2 diabetes in American Indians in a 100K genotyping array. *Diabetes* 2007; 56:3045-3052
185. Rampersaud E, Damcott CM, Fu M, Shen H, McArdle P, Shi X, Shelton J, Yin J, Chang CY, Ott SH, Zhang L, Zhao Y, Mitchell BD, O'Connell J, Shuldiner AR. Identification of novel candidate genes for type 2 diabetes from a genome-wide association scan in the Old Order Amish: Evidence for replication from diabetes-related quantitative traits and from independent populations. *Diabetes* 2007; 56: 3053-3062

186. Florez JC, Manning AK, Dupuis J, McAteer J, Irenze K, Gianniny L, Mirel DB, Fox CS, Cupples LA, Meigs JB. A 100K genome-wide association scan for diabetes and related traits in the Framingham Heart Study: Replication and integration with other genome-wide datasets. *Diabetes* 2007; 56: 3063-3074
187. Krishnamurthy J. et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006; 443, 453-537
188. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 1999; 22: 44-52
189. Mettus RV, Rane SG Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice. *Oncogene* 2003; 22: 8413-8421
190. Marzo N, Mora C, Fabregat ME, Martín J, Usac EF, Franco C et al. Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C (Cdk4) knockin mice have significantly increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that Cdk4 is a potential target for pancreatic beta cell mass regeneration in Type 1 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47: 686-694
191. Moritani M, Yamasaki S, Kagami M, Suzuki T, Yamaoka T, Sano T et al. Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF- β 1. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229: 175-184
192. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. A family of insulin -like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1262-1270
193. Ubeda M, Rukstalis JM & Habener JF Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic β -cells from glucotoxicity. *J Biol Chem* 2006; 281: 28858-28864
194. Wei FY et al. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nature Med* 2005; 11: 1104-1108
195. Staiger H, Machicao F, Stefan N, Tschritter O, Thamer C, Kantartzis K, Schäfer SA, Kirchhoff K, Fritsche A, Häring HU. Polymorphisms within novel risk loci for type 2 diabetes determine beta-cell function. *PLoS One* 2007;2(9): e832
196. Zeggini E A new era for type 2 diabetes genetics. *Diabet Med* 2007; 24, 1181-1186
197. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T de Bakker PI, Abecasis GR et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 2008; 40: 638-645
198. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006; 38: 320-323
199. Salonen JT, Uimari P, Aalto JM, Pirskanen M, Kaikkonen J, Todorova B, Hypponen J, Korhonen VP, Asikainen J, Devine C, Tuomainen TP, Luedemann J, Nauck J, Kerner W, Stephens RH, New JP, Ollier WE, Gibson JM, Payton A, Horan MA, Pendleton N, Mahoney W, Meyre D, Delplanque J, Froguel P, Luzzatto O, Yakir B, Darvasi A. Type 2 diabetes whole-genome association study in four populations: the DiaGen consortium. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 338-345
200. Hayes MG, Pluzhnikov A, Miyake K, Sun Y, Ng MCY, Roe CA, Below JE, Nicolae RI, Konkashbaev A, Bell GI, Cox NJ, Hanis CL. Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through genome-wide association studies. *Diabetes* 2007; 56: 3033-3044
201. Hanson RL, Bogardus C, Duggan D, Kobes S, Knowlton M, Infante AM, Marovich L, Benitez D, Baier LJ, Knowler WC. A search for variants associated with young-onset type 2 diabetes in American Indians in a 100K genotyping array. *Diabetes* 2007; 56: 3045-3052

202. Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, Li KW, Palmen J, Miller MA, Cappuccio FP et al. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. *J Mol Med* 2006; 84: 1-10
203. Cauchi S, Meyre D, Choquet H, Dina C, Born C, Marre M, Balkau B, Froguel P: TCF7L2 variation predicts hyperglycemia incidence in a French general population: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes* 2006; 55: 3189-3192
204. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PIW, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D, for the Diabetes Prevention Program Research Group. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 2006; 355: 241-250
205. Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, Genever PG. Expression profiling and functional analysis of Wnt signalling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 849-860
206. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signalling. *Science* 2000; 289: 950-953
207. Papadopoulou S, Edlund H Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. *Diabetes* 2005; 54: 2844-2851
208. Smith U TCF7L2 and type 2 diabetes – we WNT to know- commentary. *Diabetologia* 2007; 50: 5-7
209. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjögren M, Ling C, Eriksson K-F, Lethagen ÅL, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, del Prato S, Groop L. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2007; 117: 2155-2163
210. Melzer D, Murray A, Hurst AJ, Weedon MN, Bandinelli S, Corsi AM, Ferrucci L, Paolisso G, Guralnik JM, Frayling TM: Effects of the diabetes linked TCF7L2 polymorphism in a representative older population. *BMC Med* 2006, 4: 34
211. Helgason A, Palsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, Gunnarsdottir S, Adeyemo A, Chen Y, Chen G, Reynisdottir I et al. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet* 2007, 39: 218-225
212. Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjögren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, Lindblad U, Daly MJ, Tuomi T, Hirschhorn JN, Ardlie KG, Groop LC, Altshuler D. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 2006; 55: 2890-2895
213. Loos RJF, Franks PW, Francis RW, Barroso I, Gribble FM, Savage DB, Ong KK, O'Rahilly S, Wareham NJ 2007 TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and β -cell function in a British European population. *Diabetes* 56: 1943-1947.
214. Munoz J, Lok KH, Gower BA, Fernandez JR, Hunter GR, Lara-Castro C et al. Polymorphism in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with reduced insulin secretion in non-diabetic women. *Diabetes* 2006, 55: 3630-3634
215. Marzi C, Huth C, Kolz M, Grallert H, Meisinger C, Wichmann HE et al. Variants of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) are strongly associated with type 2 diabetes but not with the metabolic syndrome in the MONICA/KORA surveys. *Horm Metab Res* 2007; 39: 46-52
216. Freathy RM, Weedon MN, Bennett A, Hypponen E, Relton CL, Knight B et al Type 2 diabetes TCF7L2 risk genotypes alter birth weight: a study of 24053 individuals. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 1150-1161
217. Schafer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, Holst JJ, Dekker JM, T'Hart LM, Nijpels G, van Haften TW, Haring HU, Fritsche A. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia* 2007; 50: 2443-2450

218. Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, Schafer SA, Tschrirter O, Staiger H, Stefan N, Haring HU, Fritsche A. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia* 2008; 51: 597-601
219. Neel V. Diabetes Mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by progress? *Am J Hum Genet* 1962; 14: 352-62.
220. Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissén M, Ehrnström BO, Forsén B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR. Metabolic Consequences of a Family History of NIDDM (The Botnia Study) – Evidence for Sex-Specific Parental Effects. *Diabetes* 1996; 45: 1585-1593
221. Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 2005; 307, 373-375
222. Prentice AM, Rayco-Solon P, Moore SE. Insights from the developing world: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 153-161
223. Hales C and Barker D. Type 2 diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35: 595-601
224. Melander O, Mattiasson I, Marsal K, Groop L, Hulthen L. Heredity for hypertension influences intrauterine growth and the relation between foetal growth and adult blood pressure. *J Hypertension* 1999; 17: 1557-1561
225. Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Perfekt R, Lahti K, Isomaa B, Forsen B, Nissén M, Homström N, Saloranta C, Taskinen M-R, Groop L and Tuomi . Predictors and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54; 166-174
226. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 1070-1077
227. Lorenzo C, Okolosie M, Williams K, Stern MP, Haffner SM. The metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 2003; 26: 3153-3159
228. Tirosh A, Shai I, Tekes-Manova D, Israeli E, Peger D, Shochat T, Kochba I, Rudich A, for Israeli Research Group. Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. *New Engl J Med* 2005; 353: 1454-1462
229. Turner NC, Clapham JC. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulindependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Prog Drug Res* 1998; 51: 33-94
230. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 351-356
231. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathophysiology of prediabetes. *Current Diabetes Reports* 2009; 9: 193-199
232. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contribution of beta cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 2006; 29:1130–1139
233. Hanefeld M, Koehler C, Fuecker K, Henkel E, Schaper F, Temelkova-Kurktschiev T, the Impaired Glucose Tolerance for Atherosclerosis and Diabetes study. Insulin secretion and insulin sensitivity pattern is different in isolated impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose: the risk factor in Impaired Glucose Tolerance for Atherosclerosis and Diabetes study. *Diabetes Care* 2003; 26: 868–874
234. Abdul-Ghani MA, Sabbah M, Kher J, Minuchin O, Vardi P, Raz I. Different contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction in overweight Israeli Arabs with IFG and IGT. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22:126 –130

235. Weyer C, Bogardus C, Pratley RE. Metabolic characteristics of individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1999; 48:2197–203
236. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, Jenkinson C, Richardson D, DeFronzo RA. Insulin secretion and insulin action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study (VEGAS). *Diabetes* 2006; 55(5): 1430-1435
237. Wasada T, Kuroki H, Katsumori K, Arai H, Sato A, Aoki K, Jimba S, Hanai G. Who are more insulin resistant, people with IFG or people with IGT? *Diabetologia* 2004; 47:758 –759
238. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 1989, 84: 205–213
239. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, Jenkinson C, et al. Adipocytes in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance are resistant to the antilipolytic effect of insulin. *Acta Diabetol* 2008, 45: 147–150
240. Vauhkonen I, Niskanen L, Vanninen E, Kainulainen S, Uusitupa M, Laakso M. Defects in insulin secretion and insulin action in non-insulin-dependent diabetes mellitus are inherited: metabolic studies on offspring of diabetic probands. *J Clin Invest* 1998; 101: 86 –96
241. Arslanian SA, Bacha F, Saad R, Gungor N. Family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin sensitivity and an impaired balance between insulin sensitivity and insulin secretion in white youth. *Diabetes Care* 2005; 28: 115– 119
242. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003; 46: 3–19
243. Meyer C, Pimenta W, Woerle HJ, et al. Different mechanisms for impaired fasting glucose and impaired postprandial glucose tolerance in humans. *Diabetes Care* 2006, 29: 1909–1914
244. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Jenkinson C, et al. The relationship between fasting hyperglycemia and insulin secretion in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol* 2008, 295: E401–E406
245. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, et al. Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio metabolism (SAM) study. *Diabetologia* 2004, 47: 31–39
246. Laakso M, Zilinskaite J, Hansen T, et al. Insulin sensitivity, insulin release and glucagon-like peptide-1 levels in persons with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance in the EUGENE2 study. *Diabetologia* 2008, 51: 502–511
247. van Haeften TW, Pimenta W, Mitrakou A, et al.: Disturbances in beta-cell function in impaired fasting glycemia. *Diabetes* 2002, 51(Suppl 1): S265–S270.
248. Pimenta WP, Santos ML, Cruz NS, et al.: Brazilian individuals with impaired glucose tolerance are characterized by impaired insulin secretion. *Diabetes Metab* 2002, 28: 468–476
249. Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, et al. Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *JAMA* 2007; 298: 765-775
250. Barsness GW, Peterson ED, Ohman EM, et al. Relationship between diabetes mellitus and long-term survival after coronary bypass and angioplasty. *Circulation* 1997; 96: 2551–2556
251. Wackers FJT, Young LH, Inzucchi SE, et al. Detection of silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic subjects: the DIAD study. *Diabetes care* 2004; 27: 1954-1961
252. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH. Meta-analysis: glycosylated haemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 141:421–431

253. Bianchi C, Penno G, Malloggi L, Barontini R, Corfini M, Giovannitti MG, Di Cianni G, Del Prato S, Miccoli R. Non-traditional markers of atherosclerosis potentiate the risk of coronary heart disease in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Nutrition Metabolism & Cardiovascular Disease* 2008; 18: 31-38
254. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D, for the Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16:434-444
255. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. *Diabetes Care* 1998; 21: 1167-1173
256. Gerstein HC. Is glucose a continuous risk factor for cardiovascular mortality? *DiabetesCare* 1999; 22: 659-660
257. Levitan EB, Song Y, Ford ES, Liu S. Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of prospective studies. *Arch Intern Med* 2004; 164(19): 2147-2155
258. Jarrett RJ, McCartney P, Keen H. The Bedford survey: ten year mortality rates in newly diagnosed diabetics, borderline diabetics and normoglycaemic controls and risk indices for coronary heart disease in borderline diabetics. *Diabetologia* 1982; 22: 79-84
259. Butler WJ, Ostrander LD Jr, Carman WJ, Lamphiear DE. Mortality from coronary heart disease in the Tecumseh study: long term effect of diabetes mellitus, glucose tolerance and other risk factors. *Am J Epidemiol* 1985; 121: 541-547
260. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. a metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999; 22: 233-240
261. Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Blood glucose and risk of cardiovascular disease in the Asia Pacific region. *Diabetes Care* 2004; 27: 2836-2842
262. Murray CJ, Ezzati M. Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment. *Lancet* 2006; 368: 1651-1659
263. Balkau B, Bertrais S, Ducimetiere P, Eschwege E. Is there a glycemic threshold for mortality risk? *Diabetes Care* 1999; 22:696-699
264. DECODE Study Group, on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 1999; 354: 617-621
265. DECODE Study Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 2001; 161: 397-405
266. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose: the Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999; 22: 920 -924
267. de Vegt F, Dekker JM, Ruhe HG, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, Heine RJ. Hyperglycaemia is associated with all cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia* 1999; 42: 926 -931
268. Rijkkelijkhuizen JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD, Dekker JM. High risk of cardiovascular mortality in individuals with impaired fasting glucose is explained by conversion to diabetes: the Hoorn study. *Diabetes Care* 2007; 30: 332-336
269. Khaw KT, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, Day N. Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 2001; 322: 15-18

270. Shan J, Edelstein S: GHb is a better predictor of cardiovascular disease than fasting or postchallenge plasma glucose in women without diabetes: the Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1996; 19:450–456
271. Barr EL, Boyko EJ, Zimmet PZ, Wolfe R, Tonkin AM, Shaw JE. Continuous relationships between non-diabetic hyperglycaemia and both cardiovascular disease and all-cause mortality: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle (AusDiab) study. *Diabetologia* 2009; 52(3): 415-424
272. Stern MP, Fatehi P, Williams K, Haffner SM. Predicting future cardiovascular disease: do we need the oral glucose tolerance test? *Diabetes Care* 2002; 25(10): 1851-1856
273. Hu G, DECODE Study Group. Gender differences in all-cause and cardiovascular mortality related to hyperglycaemia and newly-diagnosed diabetes. *Diabetologia* 2003; 46:608-17.
274. Wexler DJ, Grant RW, Meigs JB, Nathan DM, Cagliero E. Sex disparities in treatment of cardiac risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 514–520
275. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KG. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med* 2002; 19:708-23
276. Ford ES, Zhao G, Li C. Pre-diabetes and the risk for cardiovascular disease: a systematic review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(13): 1310-1317
277. Rajala U, Laakso M, Qiao Q, Keinanen-Kiukkaanniemi S. Prevalence of retinopathy in people with diabetes, impaired glucose tolerance and normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 1998; 21: 1664-1669
278. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2010. *Diabetes Care* 2010; 33 (Suppl 1): S11-61
279. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet Med* 2007; 24: 451–463
280. Paulweber B, Valensi P, Lindström J, Lalic NM, Greaves CJ, McKee M, Kissimova-Skarbek K, Liatis S, Cosson E, Szendroedi J, Sheppard KE, Charlesworth K, Felton AM, Hall M, Rissanen A, Tuomilehto J, Schwarz PE, Roden M, Paulweber M, Stadlmayr A, Kedenko L, Katsilambros N, Makrilakis K, Kamenov Z, Evans P, Gilis-Januszewska A, Lalic K, Jotic A, Djordjevic P, Dimitrijevic-Sreckovic V, Hühmer U, Kulzer B, Puhl S, Lee-Barkey YH, AlKerwi A, Abraham C, Hardeman W, Acosta T, Adler M, AlKerwi A, Barengo N, Barengo R, Boavida JM, Charlesworth K, Christov V, Claussen B, Cos X, Cosson E, Deceukelier S, Dimitrijevic-Sreckovic V, Djordjevic P, Evans P, Felton AM, Fischer M, Gabriel-Sanchez R, Gilis-Januszewska A, Goldfracht M, Gomez JL, Greaves CJ, Hall M, Handke U, Hauner H, Herbst J, Hermanns N, Herrebrugh L, Huber C, Hühmer U, Huttunen J, Jotic A, Kamenov Z, Karadeniz S, Katsilambros N, Khalangot M, Kissimova-Skarbek K, Köhler D, Kopp V, Kronsbein P, Kulzer B, Kyne-Grzebalski D, Lalic K, Lalic N, Landgraf R, Lee-Barkey YH, Liatis S, Lindström J, Makrilakis K, McIntosh C, McKee M, Mesquita AC, Misina D, Muylle F, Neumann A, Paiva AC, Pajunen P, Paulweber B, Peltonen M, Perrenoud L, Pfeiffer A, Pölönen A, Puhl S, Raposo F, Reinehr T, Rissanen A, Robinson C, Roden M, Rothe U, Saaristo T, Scholl J, Schwarz PE, Sheppard KE, Spiers S, Stemper T, Stratmann B, Szendroedi J, Szybinski Z, Tankova T, Telle-Hjellset V, Terry G, Tolks D, Toti F, Tuomilehto J, Undeutsch A, Valadas C, Valensi P, Velickiene D, Vermunt P, Weiss R, Wens J, Yilmaz T. A European evidence-based guideline for the prevention of type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2010; 42 (Suppl 1): S3-36
281. Harris R, Donahue K, Rathore SS, Frame P, Woolf SH, Kathleen KN. Screening Adults for Type 2 Diabetes: A Review of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2003;138: 215-229
282. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334
283. Ollerton RL, Playle R, Ahmed K, Dunstan FD, Luzio SD, Owens DR. Day-to-day variability of fasting plasma glucose in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 1999; 22:394–398

284. Sato KK, Hayashi T, Harita N, et al. Combined measurement of fasting plasma glucose and A1C is effective for the prediction of type 2 diabetes. The Kansai Healthcare Study. *Diabetes Care* 2009; 32: 644-646
285. Lindström J, Tuomilehto J. The diabetes risk score: a practical tool to predict type 2 diabetes risk. *Diabetes Care* 2003; 26(3):725-731
286. ¹ Schulze MB, Hoffman K, Boeing H, Linseisen J, Rohrmann S, Möhling M, Pfeiffer AF, Spranger J, Tharmer C. An accurate risk score base on anthropometric, dietary and lifestyle factors to predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 510-515
287. Franciosi M, De Berardis G, Rossi MCE, Sacco M, Belfiglio M, Pellegrini F, Tognoni G. Use of the Diabetes Risk Score for opportunistic screening of undiagnosed diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2005; 28:1187-94
288. Saaristo T, Peltonen M, Lindstrom J, Saarikoski L, Sundvall J, Eriksson JG. Cross-selection evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score: a tool to identify undetected type 2 diabetes, abnormal glucose tolerance and metabolic syndrome. *Diab Vasc Dis Res* 2005; 2: 67-72
289. Schwarz PE, Li J, Reimann M, Schutte AE, Bergmann A, Hanefeld M, Bornstein SR, Schulze J, Tuomilehto J, Lindström J. The Finnish Diabetes Risk Score is associated with insulin resistance and progression towards type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(3): 920-926
290. Schwarz PE, Li J, Lindstrom J, Tuomilehto J. Tools for predicting the risk of type 2 diabetes in daily practice. *Horm Metab Res* 2009; 41(2): 86-97
291. Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB Sr. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med* 2007; 167(10): 1068-1074
292. Meigs JB. Prediction of type 2 diabetes: the dawn of polygenetic testing for complex disease. *Diabetologia* 2009; 52(4): 568-570.
293. Meigs JB, Shrader P, Sullivan LM, McAteer JB, Fox CS, Dupuis J, Manning AK, Florez JC, Wilson PW, D'Agostino RB Sr, Cupples LA. Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359(21): 2208-2219.
294. Prevention of diabetes mellitus, Report of a WHO Study Group, WHO Technical Report Series, No. 844, Geneva World Health Organization, 1994
295. Satterfield DW, Murphy D, Essien JD et al. Community-based lifestyle interventions to prevent type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2643-2652
296. Pan XR, Li GW, Hu YH et al. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: the Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 1997; 20: 537-544
297. Li G, Zhang P, Wang J, Gregg EW, Yang W, Gong Q, Li H, Li H, Jiang Y, An Y, Shuai Y, Zhang B, Zhang J, Thompson TJ, Gerzoff RB, Roglic G, Hu Y, Bennett PH. The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. *Lancet* 2008;371(9626): 1783-1789
298. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al. Finnish diabetes prevention study group: Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344: 1343-1350
299. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al. Diabetes prevention program research group: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346: 393-403

300. Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemiö K, Hämäläinen H, Härkönen P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Mannelin M, Paturi M, Sundvall J, Valle TT, Uusitupa M, Tuomilehto J; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 2006; 368(9548): 1673-1679
301. Ramachandran A, Snehalatha C, Mary S, Mukesh B, Bhaskar AD, Vijay V. The Indian Diabetes Prevention shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in Asian Indian with Impaired Glucose Tolerance (IDPP-1). *Diabetologia* 2006; 49: 289-297
302. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002; 51: 2796-2803
303. DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators; Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1096-105
304. DeFronzo RA, for ACT NOW Study Group. ACTos NOW Study for the Prevention of Diabetes (ACT NOW) Study. Late-breaking abstract presented at 68th Annual Scientific Sessions of the American Diabetes Association, 6 June 2008, San Francisco, CA
305. Zinman B, Harris SB, Neuman J, Gerstein HC, Retnakaran RR, Raboud J, Qi Y, Hanley AJ. Low-dose combination therapy with rosiglitazone and metformin to prevent type 2 diabetes mellitus (CANOE trial): a double-blind randomised controlled study. *Lancet* 2010; 376(9735): 103-111
306. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, STOP-NIDDM trial research group. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet* 2002; 359: 2072-2077
307. NAVIGATOR Study Group, Holman RR, Haffner SM, McMurray JJ, Bethel MA, Holzhauer B, Hua TA, Belenkov Y, Boolell M, Buse JB, Buckley BM, Chacra AR, Chiang FT, Charbonnel B, Chow CC, Davies MJ, Deedwania P, Diem P, Einhorn D, Fonseca V, Fulcher GR, Gaciong Z, Gaztambide S, Giles T, Horton E, Ilkova H, Jenssen T, Kahn SE, Krum H, Laakso M, Leiter LA, Levitt NS, Mareev V, Martinez F, Masson C, Mazzone T, Meaney E, Nesto R, Pan C, Prager R, Raptis SA, Rutten GE, Sandstroem H, Schaper F, Scheen A, Schmitz O, Sinay I, Soska V, Stender S, Tamás G, Tognoni G, Tuomilehto J, Villamil AS, Vozár J, Califf RM. Effect of nateglinide on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2010;362(16): 1463-1476
308. NAVIGATOR Study Group, McMurray JJ, Holman RR, Haffner SM, Bethel MA, Holzhauer B, Hua TA, Belenkov Y, Boolell M, Buse JB, Buckley BM, Chacra AR, Chiang FT, Charbonnel B, Chow CC, Davies MJ, Deedwania P, Diem P, Einhorn D, Fonseca V, Fulcher GR, Gaciong Z, Gaztambide S, Giles T, Horton E, Ilkova H, Jenssen T, Kahn SE, Krum H, Laakso M, Leiter LA, Levitt NS, Mareev V, Martinez F, Masson C, Mazzone T, Meaney E, Nesto R, Pan C, Prager R, Raptis SA, Rutten GE, Sandstroem H, Schaper F, Scheen A, Schmitz O, Sinay I, Soska V, Stender S, Tamás G, Tognoni G, Tuomilehto J, Villamil AS, Vozár J, Califf RM. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2010; 362(16): 1477-1490
309. Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjöström L. Xenical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study. a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 2004; 27: 155-661
310. Gillies CL, Abrams KR, Lambert PC, Cooper NJ, Sutton AJ, Hsu RT, Khunti K. Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 334(7588): 299
311. Rosenstock J, Klaff LJ, Schwartz S, Northrup J, Holcombe JH, Wilhelm K, Trautmann M. Effects of exenatide and lifestyle modification on body weight and glucose tolerance in obese subjects with and without pre-diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33(6): 1173-1175

312. Astrup A, Rössner S, Van Gaal L, Rissanen A, Niskanen L, Al Hakim M, Madsen J, Rasmussen MF, Lean ME; NN8022-1807 Study Group. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 2009; 374(9701): 1606-1616
313. O'Brien K MacDonald KG Jr, Leggett-Frazier N, Swanson MS, Pories WJ, Caro JF. Weight loss in severely obese subjects prevents the progression of impaired glucose tolerance to type II diabetes. A longitudinal interventional study. *Diabetes Care* 1994; 17: 372-375
314. Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD, Sullivan M, Wedel H; Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004; 351: 2683-2693
315. Pontiroli AE, Folli F, Paganelli M, Micheletto G, Pizzocri P, Vedani P, Luisi F, Perego L, Morabito A, Bressani Doldi S. Laparoscopic gastric banding prevents type 2 diabetes and arterial hypertension and induces their remission in morbid obesity: a 4-year casecontrolled study. *Diabetes Care* 2005; 28: 2703-2709
316. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely RD, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, Gaw A. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001; 103: 357-362
317. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R; Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 2005-2016
318. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial - Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 1149-1158
319. Keech A, Colquhoun D, Best J, Kirby A, Simes RJ, Hunt D, Hague W, Beller E, Arulchelvam M, Baker J, Tonkin A; LIPID Study Group. Secondary prevention of cardiovascular events with long-term pravastatin in patients with diabetes or impaired fasting glucose: results from the LIPID trial. *Diabetes Care* 2003; 26: 2713-2721
320. Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, Barzilai N, Alderman M, Ridker PM. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2009; 32(10): 1924-1929
321. Padwal R, Laupacis A. Antihypertensive therapy and incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2004; 27: 247-255.
322. DREAM Trial Investigators, Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, Dagenais G, Diaz R, Avezum A, Lanas F, Probstfield J, Fodor G, Holman RR. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med* 2006; 355(15): 1551-1562
323. Absetz P, Valve R, Oldenburg B, Heinonen H, Nissinen A, Fogelholm M, et al. Type 2 diabetes prevention in the "real world": one-year results of the GOAL Implementation Trial. *Diabetes Care* 2007; 30: 2465-2470
324. Ackermann RT, Finch EA, Brizendine E, Zhou H, Marrero DG. Translating the diabetes prevention program into the community. The DEPLOY Pilot Study. *Am J Prev Med* 2008; 35: 357-363
325. Kilkkinen A, Heistaro A, Laatikainen T, Janus E, Chapman A, Absetz P, et al. Prevention of type 2 diabetes in a primary health care setting. Interim results from the Greater Green Triangle (GGT) diabetes prevention project. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 76: 460-462

326. Finnish Diabetes Association. The development programme for the prevention and care of diabetes in Finland 2000–2010 (DEHKO)
327. Schwarz PE, Lindström J, Kissimova-Scarbeck K, Szybinski Z, Barengo NC, Peltonen M, Tuomilehto J; DE-PLAN project. The European perspective of type 2 diabetes prevention: diabetes in Europe--prevention using lifestyle, physical activity and nutritional intervention (DE-PLAN) project. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116(3): 167-172
328. Haffner S, Temprosa M, Crandall J et al. Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2005; 54(5): 1566-1572
329. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, Fowler S; Diabetes Prevention Program Research Group. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 2005; 142:611-619
330. Goldberg RB, Temprosa M, Haffner S et al. Effect of progression from impaired glucose tolerance to diabetes on cardiovascular risk factors and its amelioration by lifestyle and metformin intervention: the Diabetes Prevention Program randomized trial by the Diabetes Prevention Program Research Group. *Diabetes Care* 2009; 32(4):726-32
331. Uusitupa M, Peltonen M, Lindström J et al. Ten-year mortality and cardiovascular morbidity in the Finnish Diabetes Prevention Study--secondary analysis of the randomized trial. *PLoS* 2009;4(5):e5656
332. Lonn EM, Gerstein HC, Sheridan P, Smith S, Diaz R, Mohan V, Bosch J, Yusuf S, Dagenais GR; DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) and STARR Investigators. Effect of ramipril and of rosiglitazone on carotid intima-media thickness in people with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: STARR (STudy of Atherosclerosis with Ramipril and Rosiglitazone). *J Am Coll Cardiol* 2009; 53(22): 2028-2035

Introduzione

Il numero di pazienti con diabete mellito tipo 2 (DM2) sta crescendo velocemente in tutto il mondo (1). La principale causa di questo rapido incremento può essere riconosciuta nelle modifiche dello stile di vita che si sono osservate nelle decadi passate caratterizzate da una alimentazione scorretta e dalla riduzione dell'attività fisica. Questi determinanti ambientali comportano, nei soggetti geneticamente predisposti, l'instaurarsi di alterazioni della regolazione glicemica che possono portare allo sviluppo di DM2. Le modifiche dello stile di vita e l'intervento farmacologico hanno dimostrato di essere misure efficaci per ridurre la conversione da alterata regolazione glucidica (IGR = *Impaired Glucose Regulation*) a DM2 manifesto (2). Sebbene le strategie basate sulle modifiche dello stile di vita siano caratterizzate da un'alta probabilità di successo, la loro implementazione e il mantenimento nel tempo sono piuttosto difficili. D'altra parte, l'intervento farmacologico richiede un'attenta valutazione del rapporto costo/beneficio (3).

L'individuazione di strumenti migliori per lo screening del DM2 e per l'identificazione dei soggetti a rischio elevato può favorire un intervento mirato più efficace ed economicamente vantaggioso. In tale ottica si inserisce lo studio GENFIEV (GENetica, Fisiopatologia ed Evoluzione del diabete tipo 2).

Obiettivi dello studio

Il GENFIEV (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00879801?term=GENFIEV&rank=1>) è uno studio multicentrico italiano che si propone di identificare le caratteristiche genotipiche e fenotipiche dei soggetti che sviluppano DM2. I soggetti con alterata glicemia a digiuno (IFG = *Impaired Fasting Glucose*) o alterata tolleranza ai carboidrati (IGT = *Impaired Glucose Tolerance*), arruolati nello studio, verranno seguiti per 6 anni al fine di stimare il tasso di conversione verso DM2, identificare i soggetti a maggior rischio di progressione di malattia e valutare i meccanismi fisiopatologici responsabile di tale conversione. Presupposto fondamentale per lo studio longitudinale è l'identificazione dei soggetti con IGR (IFG, IGT, IFG+IGT), la valutazione delle loro caratteristiche antropometriche, metaboliche, biochimiche basali e genetiche, nonché il loro confronto con soggetti con normale regolazione glucidica (NGT = *Normal Glucose Tolerance*). Pertanto, obiettivi di questa fase trasversale di studio sono stati:

- Valutazione della prevalenza delle differenti classi di IGR e di DM2 non noto tra soggetti a rischio di DM2,
- Validazione nella popolazione Italiana del questionario FINDRISC per l'identificazione dei soggetti con IGR o con DM2 non noto,
- Identificazione di caratteristiche fisiopatologiche associate a IGR e DM2 non-noto,
- Studio del metabolismo del glucosio durante curva da carico orale di glucosio (OGTT = *Oral Glucose Tolerance Test*) nei soggetti a rischio di DM2 e della secrezione insulinica e insulino-resistenza (IR),
- Caratterizzazione fenotipica dei soggetti con IGR: valutazione della prevalenza di sindrome metabolica (SM) nelle diverse categorie di IGR,
- Caratterizzazione genotipica dei soggetti con IGR: prevalenza di polimorfismi associati a diabete e loro impatto su azione e secrezione insulinica.

Pazienti, materiali e metodi

Nell'arco di 3 anni (dal 2003 al 2005) sono stati arruolati nello studio GENFIEV 1017 soggetti (589 donne e 428 uomini), indirizzati dal medico di medicina generale al Centro Diabetologico perché ad alto rischio di DM2 (screening opportunistico). Costituivano criteri di esclusione dallo studio: uso di farmaci con nota interferenza con il metabolismo glucidico (ad esempio corticosteroidi), gravidanza o allattamento al seno o terapia ormonale sostitutiva, malattia aterosclerotica attiva (angina instabile, infarto del miocardio, eventi cerebrovascolari, ...) nei 3 mesi precedenti allo screening, storia di patologia neoplastica, ipertensione o ipotiroidismo non controllato, storia di abuso di alcool o droga, malattie epatiche in fase di attività.

Dopo consenso informato, tutti i soggetti sono stati sottoposti al questionario FINDRISC (Tab. 1; 4) ed alla raccolta dell'anamnesi familiare, patologica e fisiologica, compresa la valutazione dell'attività fisica svolta, dell'abitudine al fumo di sigaretta e il consumo di alcool. Il rischio di DM2 in relazione allo score del FINDRISC veniva considerato basso se <10 , modesto se compreso fra 10 e 14, moderato se compreso fra 15 e 19, alto se ≥ 20 . I soggetti che praticavano attività fisica per almeno 30 minuti/die sono stati ritenuti fisicamente attivi. Tutti i soggetti con storia di fumo (pregressa o presente) sono stati considerati fumatori nell'analisi dei dati.

In tutti i soggetti è stata eseguita una visita medica completa con registrazione di peso e altezza per il calcolo del BMI (Kg/m^2) e della circonferenza vita (all'altezza dell'ombelico). Due misurazioni della pressione arteriosa in posizione seduta sono state rilevate mediante sfigmomanometro a mercurio ed è stato considerato il valore medio fra le due misurazioni. E' stato registrato un ECG standard in 12 derivazioni ed eseguito un prelievo ematico a digiuno per l'estrazione del DNA (2 provette in EDTA) e per la valutazione dei parametri ematochimici di routine (emocromo, glicemia, HbA1c, profilo lipidico, funzione epatica e renale). Tutti i parametri biochimici sono stati determinati localmente mediante metodologia standard con Roche-Modular Autoanalyzer (Milano, Italia). La valutazione dell'emoglobina glicata (HbA1c) è stata effettuata mediante HPLC (Biorad, Italia). Il colesterolo LDL è stato calcolato mediante la formula di Friedewald.

Tabella 11. Fattori di rischio per diabete tipo 2 inclusi nel questionario FINDRISC e rischio stimato di sviluppare diabete a 10 anni, in relazione al punteggio totalizzato .

| Fattore | | Strato | | Punteggio |
|---|---------------------------|----------|---------|-----------|
| Età | anni ____ | <45 | | 0 |
| | | 45 – 54 | | 2 |
| | | 55 – 64 | | 3 |
| | | >64 | | 4 |
| Peso ____ | BMI ____ | <25 | | 0 |
| Altezza ____ | | 25 – 30 | | 1 |
| | | >30 | | 3 |
| Circonferenza vita | cm ____ | Uomini | Donne | |
| | | <94 | <80 | 0 |
| | | 94 – 102 | 80 – 88 | 3 |
| | | >102 | >88 | 4 |
| Esegue esercizio fisico o attività fisica nel tempo libero o al lavoro per almeno 30 minuti al giorno per la maggior parte dei giorni ? | Si | | | 0 |
| | No | | | 2 |
| La sua dieta comprende vegetali o frutta tutti i giorni ? | Ogni giorno | | | 0 |
| | Non tutti i giorni | | | 2 |
| Ha mai fatto uso di farmaci anti-ipertensivi ? | No | | | 0 |
| | Si | | | 2 |
| Le è mai stato detto da un medico o da altro operatore sanitario di avere avuto una glicemia elevata (nel corso di una visita medica, durante una malattia o durante la gravidanza) ? | No | | | 0 |
| | Si | | | 5 |
| Qualcuno dei suoi familiari è diabetico ? | No | | | 0 |
| | Si: familiari di II grado | | | 3 |
| | Si: familiari di I grado | | | 5 |
| PUNTEGGIO TOTALE | | | | |
| Rischio di sviluppare diabete a 10 anni: | | | | |
| <10 | Basso: 1 su 100 | | | |
| 10 – 14 | Modesto: 1 su 25 | | | |
| 15 – 19 | Moderato: 1 su 6 | | | |
| 20 – 24 | Alto: 1 su 3 | | | |
| >24 | Molto alto: 1 su 2 | | | |

Tutti i soggetti sono stati, quindi, sottoposti ad OGTT con 75 g di glucosio, dopo digiuno notturno e astensione dal fumo di sigaretta nelle 12 ore precedenti il test. Per l'esecuzione dell'esame è stata posta una cannula in una vena di un braccio in senso antecubitale per i prelievi ematici. Glicemia, insulinemia e C-peptide sono stati determinati in condizioni di digiuno. Tutti i soggetti hanno, quindi, ingerito nell'arco di 5 minuti, 75 g di glucosio sciolto in 250 ml di acqua. Prelievi ematici per la determinazione di glicemia e C-peptide sono

stati effettuati a 15, 30, 60, 90 e 120 minuti dal carico di glucosio. Insulina e C-peptide sono stati misurati centralmente nel laboratorio di Pisa mediante metodo immunometrico (Immulite, DPC; Los Angeles, USA).

Infine, in tutti i soggetti è stato calcolato il rischio di mortalità cardiovascolare a 10 anni mediante l'*HeartScore* (www.heartscore.org).

Sulla base dell'OGTT i soggetti sono stati divisi in NGT, IFG, IGT, IFG+IGT e DM2 in accordo con i criteri dell'*American Diabetes Association* (ADA) del 1997 (5). La SM è stata definita in accordo con i criteri NCEP-ATPIII (6), IDF (7) ed i più recenti criteri IDF/AHA/NHLBI (8). Nell'analisi dei dati è stata utilizzata la definizione NCEP-ATPIII, se non diversamente specificato.

L'area sotto la curva (AUC = *Area Under the Curve*) di glicemia e C-peptide durante OGTT è stata calcolata utilizzando il metodo trapezoidale (9).

L'indice HOMA-IR è stato calcolato secondo la formula $[\text{insulinemia a digiuno (mU/l)} \times \text{glicemia a digiuno (mmol/l)}] / 22.5$, come descritto da Matthews et al (10). La condizione di IR è stata arbitrariamente definita per valori di HOMA-IR $>75^{\circ}$ percentile dei soggetti NGT.

L'indice insulinogenico è stato calcolato come $CP_{30} - CP_0 / 18 * (G_{30} - G_0)$, dove CP_0 e G_0 rappresentano i livelli di C-peptide e glicemia digiuno, rispettivamente, mentre CP_{30} e G_{30} i loro livelli a 30 minuti (11). Valori di Indice Insulinogenico $<25^{\circ}$ percentile dei soggetti NGT sono stati arbitrariamente considerati come indicativi di deficit della funzione secretoria.

Il *Disposition index* (performance β -cellulare) è stato calcolato come rapporto fra indice insulinogenico e HOMA-IR (12).

L'indice surrogato di funzione β -cellulare HOMA-B è stato calcolato secondo la formula: $20 \times \text{insulinemia a digiuno (}\mu\text{IU/ml)} / \text{glicemia a digiuno (mmol/ml)} - 3.5$.

La secrezione insulinica è stata valutata anche mediante applicazione del modello minimale basato sulle concentrazioni di C-peptide durante OGTT. Questo modello fornisce tre parametri indipendenti di secrezione insulinica: la secrezione insulinica basale, il controllo derivativo, ovvero la sensibilità delle β -cellule alla velocità di incremento delle concentrazioni di glucosio plasmatico, e il controllo proporzionale, cioè la curva dose-risposta per concentrazioni plasmatiche di glucosio pari a 4.0, 5.5, 8.0 e 11.0 mM.

Per le analisi genetiche l'estrazione del DNA è stata effettuata manualmente da leucociti periferici. La genotipizzazione è stata effettuata con TaqMan (Fig. 1) che prevede amplificazione del DNA mediante PCR, discriminazione allelica e rilevazione dei polimorfismi. Gli SNP studiati sono stati: rs7903146 di *TCF7L2* → allele di rischio T e rs1111875 di *HHEX/IDE* → allele di rischio G.

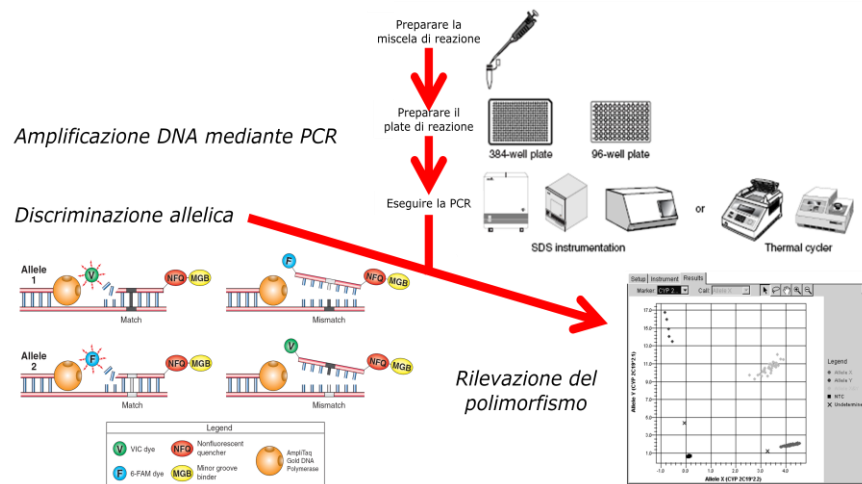


Figura 24. Tecnica di genotipizzazione TaqMan.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software StatView (SAS Institute; Cary , NC) su Power Mac G5 (Apple; Cupertino, CA). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard o mediana \pm range interquartile per i parametri che non seguono una distribuzione normale. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per testare le differenze medie fra gruppi, mentre per confrontare le variabili categoriche sono stati impiegati test non-parametrici. La regressione logistica multipla è stata impiegata per valutare l'associazione fra due o più variabili ed i risultati di tali analisi sono espressi come odds ratio (OR) con 95% intervallo di confidenza (IC). Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

I soggetti reclutati nello studio GENFIEV sono stati 1017 (589 donne e 428 uomini) di età media pari a 49 ± 11 anni, BMI 29.2 ± 5.3 Kg/m². Le principali caratteristiche antropometriche, cliniche e biochimiche della popolazione dello studio sono riportate nella Tabella 2.

Tabella 12. Principali caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione dello studio.

| | Media \pm DS | Range |
|---------------------------------------|------------------|-------------|
| N. (Uomini/donne) | 1017 (589/428) | |
| Età (anni) | 49 \pm 11 | 21 - 64 |
| BMI (Kg/m ²) | 29.2 \pm 5.3 | 16.5 - 51.2 |
| Circonferenza vita (cm) | 102.6 \pm 14.5 | 62 - 149 |
| Pressione arteriosa sistolica (mmHg) | 129 \pm 16 | 84 - 201 |
| Pressione arteriosa diastolica (mmHg) | 82 \pm 11 | 58 - 128 |
| Glicemia a digiuno (mg/dl) | 98 \pm 16 | 63 - 210 |

- Prevalenza delle differenti classi di alterata regolazione glicemica e di diabete tipo 2 non noto

Sulla base dell'OGTT la popolazione dello studio GENFIEV risultava NGT nei 50% dei casi, IGF nel 4%, IGT nel 23%, IFG+IGT nell'8% e DM2 nel 10%. Un ulteriore 5% dei soggetti aveva valori di glicemia a digiuno diagnostici per DM2. Applicando il *cut-off* di glicemia a digiuno più basso (100 mg/dl) proposto nel 2003 dall'ADA per identificare i soggetti con IFG, la percentuale di soggetti con IGR aumenta (42% vs. 35%); in particolare, si osserva un aumento degli individui con IFG 11% e IFG+IGT (11% e 25%, rispettivamente) ed una riduzione dei soggetti NGT e con IGT isolato (43% e 15%, rispettivamente; Fig. 2).

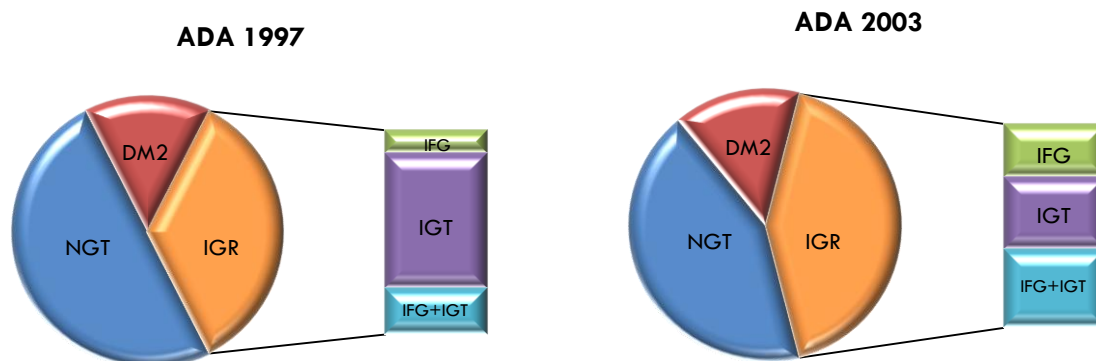


Figura 25. Prevalenza delle differenti classi di regolazione glicemica in relazione ai criteri utilizzati (ADA 1997 vs. ADA 2003).

La Tabella 3 mostra le principali caratteristiche antropometriche e biochimiche della popolazione in studio in relazione alla classe di regolazione glicemica.

Tabella 13. Caratteristiche antropometriche e biochimiche della popolazione in relazione alla classe di regolazione glicemica. ANOVA per età, BMI, circonferenza vita e ipertensione: $p < 0.0001$; ANOVA per trigliceridi: $p < 0.02$.

| Parametro | NGT | IFG | IGT | IFG+IGT | DM2 |
|-------------------------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| N. | 508 | 41 | 234 | 81 | 153 |
| Età (anni) | 46±12 | 51±8 | 52±10 | 54±7 | 55±9 |
| Circonferenza vita (cm) | 99±14 | 96±12 | 102±13 | 100±1 | 104±17 |
| BMI (Kg/m ²) | 29±5 | 27±5 | 30±5 | 29±4 | 30±6 |
| Ipertensione (%) | 39 | 60 | 62 | 65 | 71 |
| Glicemia a digiuno (mg/dl) | 89±9 | 115±5 | 95±9 | 115±4 | 121±20 |
| Colesterolo totale (mg/dl) | 207±41 | 200±27 | 215±41 | 215±40 | 206±35 |
| LDL (mg/dl) | 132±38 | 129±28 | 136±38 | 142±35 | 138±33 |
| HDL (mg/dl) | 55±15 | 54±12 | 51±13 | 46±11 | 47±12 |
| Trigliceridi (mg/dl) | 122±84 | 99±49 | 158±99 | 178±118 | 165±106 |
| Insulinemia a digiuno (mU/ml) | 10.5±6.8 | 13.4±14.5 | 11.9±6.7 | 11.8±7.5 | 14±9.6 |

- Performance del questionario FINDRISC nell'identificazione dei soggetti con alterata regolazione glicemica o diabete tipo 2 non noto

Dall'analisi dei questionari FINDRISC si osservavano alcune differenze fra uomini e donne relativamente ad età (51±11 vs. 49±12 anni, $p < 0.0001$) e distribuzione dell'abitudine al fumo (non-fumatori/ex-/fumatori: 36/42/22% vs. 57/21/22%, $p < 0.0001$). Non vi erano, invece, differenze fra uomini e donne per familiarità per DM2

(64% vs. 70%), rilievo anamnestico di elevati valori glicemici (34% vs. 28%), consumo giornaliero di vegetali o frutta (83% vs. 86%), uso di anti-ipertensivi (28% vs. 26%). L'inattività fisica era più frequente tra le donne (74% vs. 66%), la distribuzione del BMI (<25, 25-30, >30 kg/m²: 23/48/29% vs. 27/30/43%, $p<0.0001$) e della circonferenza alla vita (<94/80, 94-102/80-88, >102/88 cm: 24/34/42% vs. 8/16/76%, $p<0.0001$) erano più sfavorevoli nelle donne, la distribuzione per classi di età (<45, 45-54, 55-64, ≥ 65 : 26/27/35/12% vs. 37/25/27/11%, $p=0.003$) più sfavorevole negli uomini. La distribuzione per classi di rischio di DM2 secondo lo score del FINDRISC (basso, modesto, moderato e alto) era sovrapponibile tra uomini e donne ($X^2=6.36$, $p=0.17$; Fig. 3).

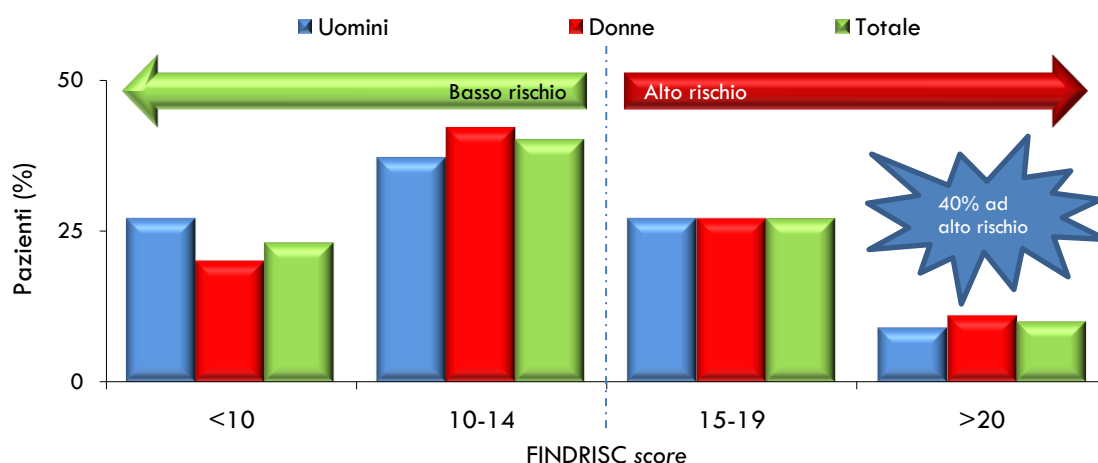


Figura 26. Distribuzione del FINDRISC score.

La prevalenza di soggetti con IFG (15.2% vs. 11.3%) IGT±IFG (31.3% vs. 29.0%) e DM2 (17.2% vs. 6.5%) è risultata maggiore negli uomini ($X^2=40.74$, $p<0.0001$). La performance del FINDRISC nell'identificare soggetti con DM2 o DM2+IFG+IGT è stata valutata utilizzando lo score ≥ 15 come soglia. Nell'intera coorte, sensibilità, specificità e potere predittivo positivo (PPV) sono risultate 57%, 64%, 16% per DM2 e 52%, 77%, 72%, per DM2+IFG+IGT (negli uomini, 54%, 66% e 24% per DM2 e 48%, 79% e 79% per DM2+IFG+IGT, nelle donne 63%, 63%, 11% per DM2 e 56%, 76% e 67% per DM2+IFG+IGT). La prevalenza di IGR e DM2 aumentava con l'aumentare dello score del FINDRISC (Fig. 4).

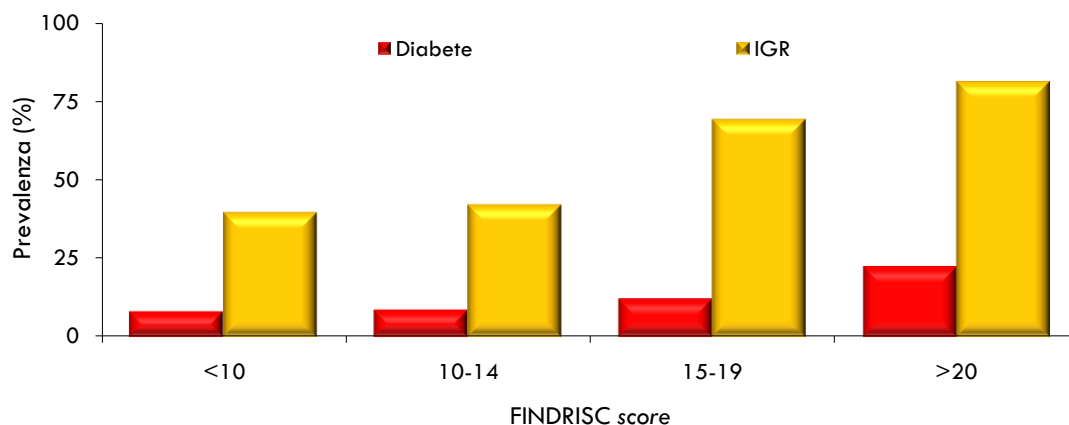


Figura 27. Prevalenza di alterata regolazione glicemica (IGR = Impaired Glucose Regulation) e diabete tipo 2 (DM2) in relazione al punteggio del questionario FINDRISC (score).

Come mostrato nella Tabella 4, all'aumentare del rischio per DM2 secondo lo score del FINDRISC si osserva un progressivo aumento dei valori di pressione sistolica e diastolica ($p < 0.0001$), di colesterolo non-HDL ($p < 0.001$), di trigliceridi ($p = 0.01$) ed una diminuzione di colesterolo HDL ($p < 0.0001$).

Tabella 14. Fattori di rischio cardiovascolare in relazione al punteggio del questionario FINDRISC. * Mediana (range interquartile).

| FINDRISC score | <10 | 10-14 | 15-19 | ≥20 | p |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
| Pressione arteriosa sistolica (mmHg) | 125±15 | 127±15 | 133±15 | 136±15 | <0.0001 |
| Pressione arteriosa diastolica (mmHg) | 77±10 | 80±10 | 82±11 | 86±10 | <0.0001 |
| Colesterolo totale (mg/dl) | 203±40 | 205±41 | 212±41 | 209±34 | =0.13 |
| Colesterolo LDL (mg/dl) | 122±35 | 122±34 | 129±38 | 129±30 | =0.07 |
| Colesterolo HDL (mg/dl) | 58±16 | 55±16 | 51±14 | 51±14 | <0.0001 |
| Colesterolo non-HDL (mg/dl) | 145±41 | 149±41 | 160±42 | 158±32 | <0.001 |
| Trigliceridi (mg/dl)* | 126 (40-292) | 136 (62-344) | 163 (62-364) | 155 (63-301) | =0.012 |

Anche un il rischio di mortalità a 10 anni per patologia cardiovascolare valutato mediante l'HeartScore aumentava in relazione allo score del FINDRISC (Fig. 5). Infine, come atteso, l'HeartScore risultava più elevato nei soggetti con IFG, IGT e DM2 rispetto ai soggetti con NGT (1.7%), 1.7%, 2.4% vs. 0.7%, rispettivamente, $p < 0.0001$; Fig. 5).

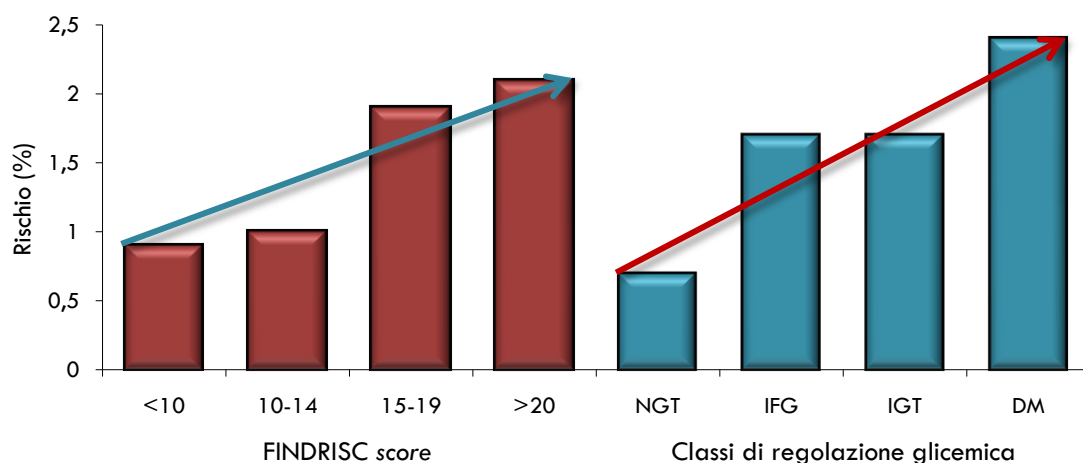


Figura 28. Rischio di mortalità cardiovascolare a 10 anni calcolato mediante *HeartScore* in relazione al punteggio del questionario FINDRISC e alle classi di regolazione glicemica.

- Glicemia, insulino-resistenza e secrezione insulinica nei soggetti a rischio di diabete

L'andamento della glicemia durante l'OGTT evidenziava che i soggetti con IFG e IGT differivano non solo per i valori di glicemia a digiuno e 2 ore dopo il carico, ma anche in differenti punti della curva (Fig. 6).

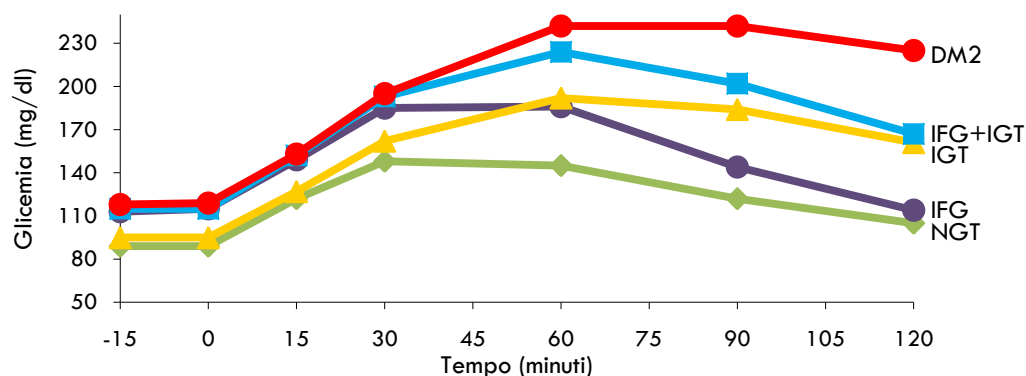


Figura 29. Andamento della glicemia durante OGTT nelle differenti classi di regolazione glicidica. ANOVA, $p < 0.0001$.

Nel soggetti NGT, le concentrazioni di glucosio durante OGTT aumentavano progressivamente, raggiungendo il picco fra 30' e 60' dopo il carico, per poi ridursi a valori < 140 mg/dl a 2 ore dal carico. I soggetti con IGT, rispetto agli NGT, avevano glicemia a digiuno sovrapponibile, ma dopo OGTT la glicemia aumentava rapidamente a 30' e continuava a salire fino a 60', rimanendo elevata (fra 140 e 200 mg/dl) a 120'

dal carico. Al contrario, i soggetti IFG presentavano valori più elevati di glicemia a digiuno rispetto agli NGT o agli IGT. Dopo ingestione di glucosio, la glicemia a 30' e 60' aumentava con valori superiori a quelli osservati nei soggetti NGT e IGT, ma si riduceva progressivamente fino a raggiungere valori <140 mg/dl a 120'. I soggetti con IFG+IGT partivano da valori di glicemia a digiuno sovrapponibili a quelli dei soggetti con IFG isolato, dopo carico di glucosio mostravano un rapido e progressivo incremento dei livelli glicemici con picco massimo intorno ai 60', successivamente la glicemia si manteneva elevata fino a 120' con valori compresi fra 140 e 200 mg/dl. Infine, i soggetti che risultavano diabetici all'OGTT, partivano da valori di glicemia a digiuno pressoché sovrapponibili a quelli dei soggetti IFG, ma si caratterizzavano per un progressivo incremento della glicemia dopo carico con picco a 60' e valori tendenzialmente superiori a quelli osservati nei soggetti IGT o IFG+IGT, successivamente la glicemia si manteneva molto elevata fino a 120' con valori ≥ 200 mg/dl.

L'insulino-sensibilità, valutata come indice HOMA-IR, peggiorava progressivamente con il ridursi della tolleranza glucidica (ANOVA, $p<0.0001$) e risultava maggiore in ogni categoria di IGR rispetto ai soggetti NGT (ANOVA, $p<0.0001$; Fig. 7). Come atteso, i livelli più elevati di HOMA-IR si osservavano nei soggetti con IFG, IFG+IGT e DM2.

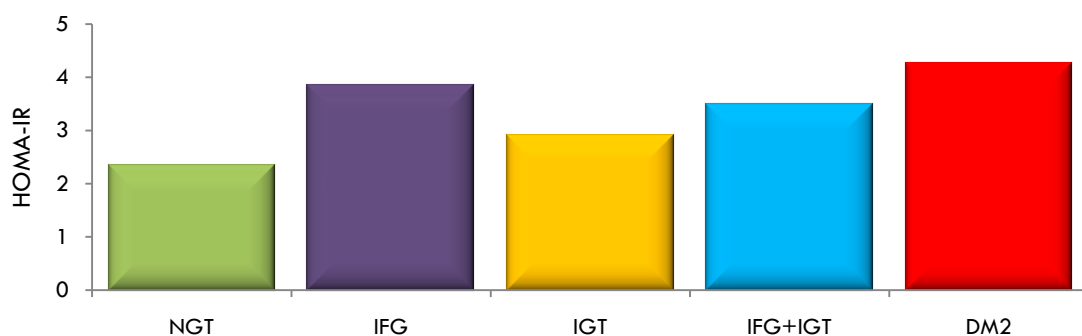


Figura 30. Valori dell'indice HOMA-IR nelle differenti categorie di regolazione glucidica. ANOVA, $p<0.0001$.

Esaminando la curva del C-peptide durante OGTT (Fig. 8) si nota che mentre i soggetti con IGT avevano un severo difetto della prima (0-30') fase di secrezione insulinica, con seconda fase (60'-120') più elevata del normale, i soggetti con IFG presentavano, invece, una prima fase di secrezione insulinica più elevata del normale. I soggetti con IFG+IGT mostravano un deficit della prima fase di secrezione con seconda fase

superiore al normale. Simile era l'andamento della secrezione nei soggetti DM2, con deficit più marcato sia della prima che della seconda fase.

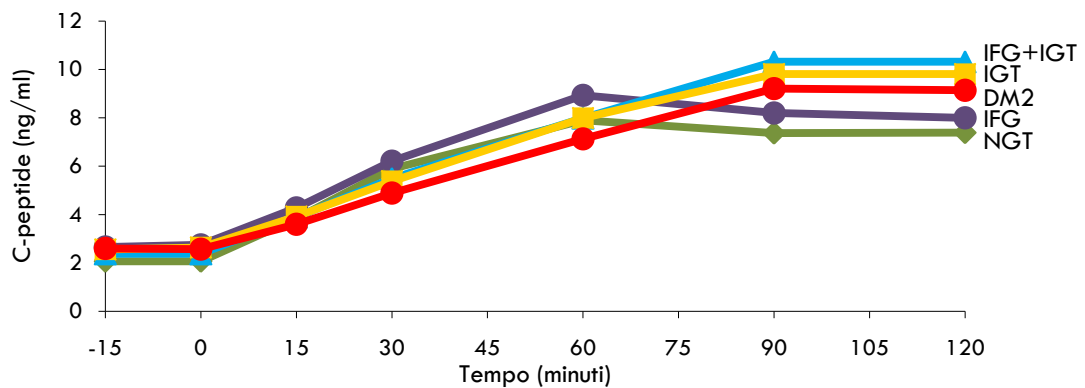


Figura 31. Andamento della concentrazione di C-peptide nel corso dell'OGTT nelle differenti classi di regolazione glucidica.

I soggetti con IFG, IGT, IFG+IGT mostravano valori di Indice Insulinogenico più bassi rispetto a quelli osservati nei soggetti NGT, ma comunque più alti rispetto a quelli presenti nei soggetti con DM2, confermando la presenza di un deficit della prima fase di secrezione insulinica in tutte le categorie di IGR e ancor più accentuato nel DM2.

Rapportando la secrezione insulinica con un indice di IR si evidenziava una progressiva compromissione della *performance* β -cellulare con il peggiorare della tolleranza glucidica, come attestato dalla progressiva riduzione del *Disposition Index* nelle diverse categorie di IGR (Fig. 9).

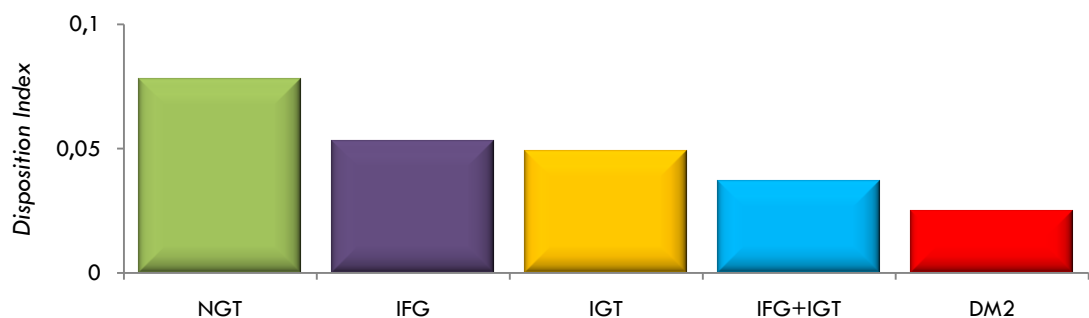


Figura 32. *Disposition Index* nelle diverse categorie di regolazione glucidica.

Al fine di valutare meglio la relazione fra secrezione insulinica e variazioni nella tolleranza glucidica, abbiamo analizzato l'intera popolazione dello studio GENFIEV in funzione dell'incremento della glicemia a 2h dell'OGTT. In particolare, i partecipanti sono stati arbitrariamente suddivisi in 9 gruppi in relazione all'incremento di 20 mg/dl dei valori di glicemia a 2h dell'OGTT, come illustrato nella Figura 10. Sulla base di questa suddivisione l'andamento dell'AUC del C-peptide appariva come una curva ad U rovesciata o a dorso d'asino, mentre si osservava un'associazione inversa con la sensibilità insulinica. L'indice HOMA-IR, infatti, aumentava progressivamente con il peggiorare della tolleranza glucidica ($r = 0.28$; $p < 0.001$).

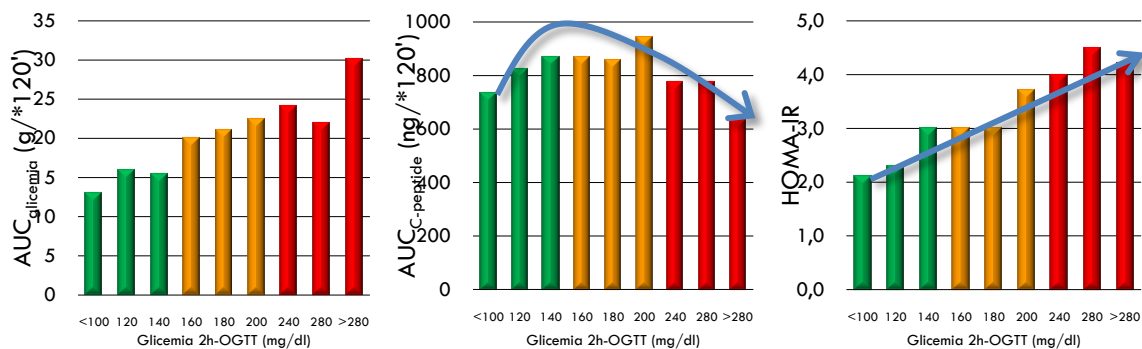


Figura 33. AUC_{glycemia}, AUC_{C-peptide} e HOMA-IR in base agli incrementi di 20 mg/dl della glicemia a 2h dell'OGTT e relativo andamento.

Tuttavia, quando i valori di AUC_{C-peptide} venivano normalizzati per i corrispondenti valori di AUC_{glycemia}, si osservava un progressivo declino lineare della secrezione β -cellulare ($r = -0.37$; $p < 0.001$; Fig. 11).

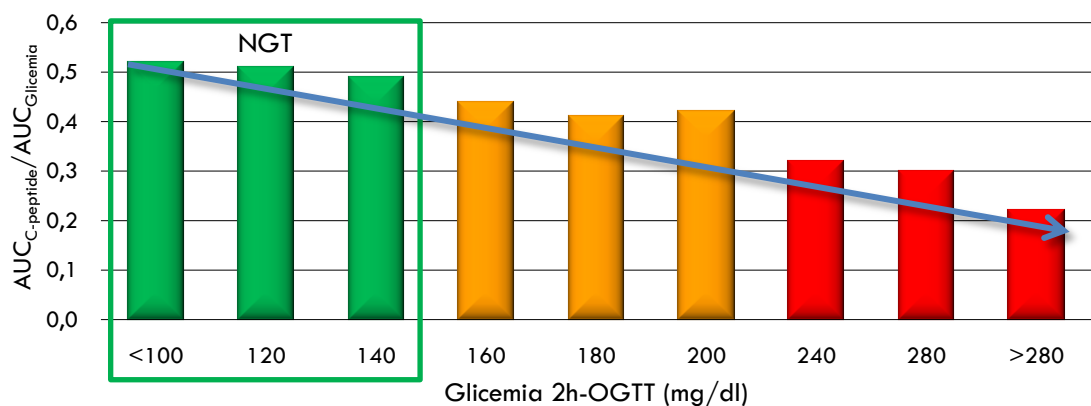


Figura 34. Rapporto AUC_{C-peptide}/AUC_{glycemia} in base agli incrementi di 20 mg/dl della glicemia a 2h dell'OGTT e relativo andamento.

Similmente, quando il rapporto $AUC_{C-peptide}/AUC_{Glicemia}$ veniva normalizzato per l'indice HOMA-IR (dato che la secrezione insulinica è il risultato della stimolazione indotta dal glucosio e dalla concomitante IR) si osservava una progressiva riduzione della funzione β -cellulare stimata per ogni incremento di 20 mg/dl della glicemia a 2h dall'OGTT ($r=-0.44$; $p < 0.001$) (Fig. 12). E' interessante notare che fra i soggetti NGT, coloro che avevano una glicemia a 2h dal carico orale di glucosio compresa fra 120 mg/dl e 140 mg/dl presentavano una riduzione della funzione β -cellulare del 34% rispetto ai soggetti NGT con glicemia a 2h dall'OGTT < 100 mg/dl, supportando l'ipotesi che la secrezione insulinica declina significativamente anche per modesti incrementi della glicemia (Fig. 12).

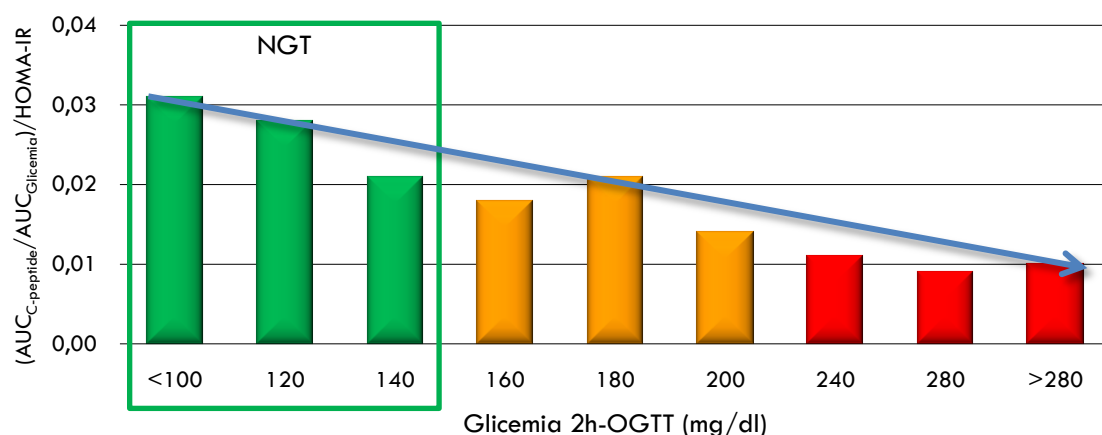


Figura 35. Stima della funzione β -cellulare, calcolata come rapporto fra $(AUC_{C-peptide}/AUC_{Glicemia})$ e indice HOMA-IR, in base a incrementi di 20 mg/dl della glicemia a 2h dall'OGTT.

La funzione β -cellulare è stata anche analizzata mediante deconvoluzione del C-peptide durante OGTT secondo il modello minimale. Nei soggetti NGT il controllo derivativo risultava $1379 \text{ pmol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ BSA per mM} \cdot \text{min}^{-1}$ (I.Q.: $900 - 2180$) mentre la curva nel controllo proporzionale era $91.5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \text{ BSA per mM}$ (I.Q.: $67.5 - 121$), 187 ($124 - 261$), 516 (I.Q.: $388 - 725$) e 903 (I.Q.: $690 - 1285$) a concentrazioni plasmatiche di glucosio pari a 4.0, 5.5, 8.0 e 11.0 mM, rispettivamente. Tutte le condizioni di IGR erano, invece, caratterizzate da alterazioni nel controllo derivativo e da deficit ancor più evidente nel controllo proporzionale (Fig. 13).

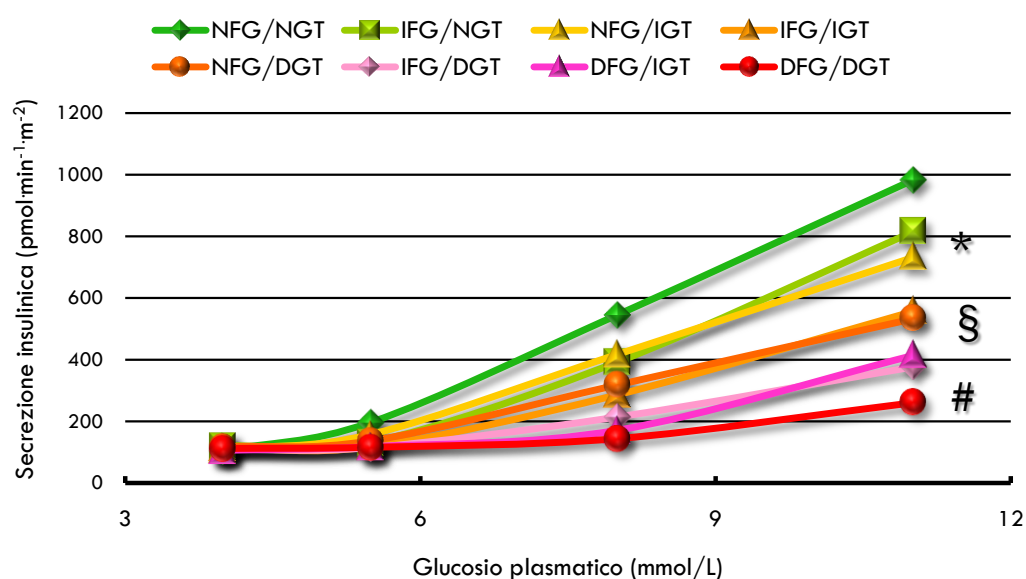


Figura 36. Secrezione insulinica stimata mediante controllo proporzionale nei differenti gruppi di regolazione glicemica. NFG = *Normal Fasting Glucose* (normale glicemia a digiuno); DFG = *Diabetic Fasting Glucose* (Glicemia a digiuno diagnostica per diabete); DGT = *Diabetic Glucose Tolerance* (Glicemia a 2h dall'OGTT diagnostica per diabete). * $p < 0.01$ vs. NFG/NGT; § $p < 0.05$ vs. NFG/IGT e IFG/NGT; # $p < 0.05$ vs. IFG/IGT e NFG/DGT.

Poiché abbiamo osservato un deterioramento della funzione β -cellulare già nell'ambito dei soggetti NGT e considerando che gli studi longitudinali hanno documentato lo sviluppo di DM2 in una discreta percentuale (30-40%) di soggetti originariamente NGT (13), abbiamo valutato se, anche nell'ambito dei soggetti NGT della popolazione del GENFIEV, concentrazioni di glicemia a 1h dall'OGTT superiori ad un *cut-off* di 155 mg/dl si associavano a IR e ad alterazioni della funzione β -cellulare ed erano indicative di un aumentato rischio di DM2 ed aterosclerosi, come suggerito da alcune recenti osservazioni (14-16). Abbiamo, pertanto, esaminato la capacità della glicemia a 1h-OGTT >155 mg/dl di identificare soggetti IGR o con DM2 ed abbiamo studiato la funzione β -cellulare, l'IR ed il profilo di rischio cardiovascolare in relazione ai valori di glicemia 1h-OGTT sopra o sotto il *cut-off* proposto. La percentuale di soggetti con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl fra gli individui nelle differenti classi di regolazione glicemica risultava: 39% negli NGT, 76% negli IFG, 90% negli IGT, 99% negli IFG+IGT e 98% nei DM2 neo-diagnosticati (Fig. 14). Questo *cut-off* ha un'alta specificità (89%), una buona sensibilità (69%) ed un alto potere predittivo positivo (92%) nell'identificare soggetti con IFG, IGT o DM2.

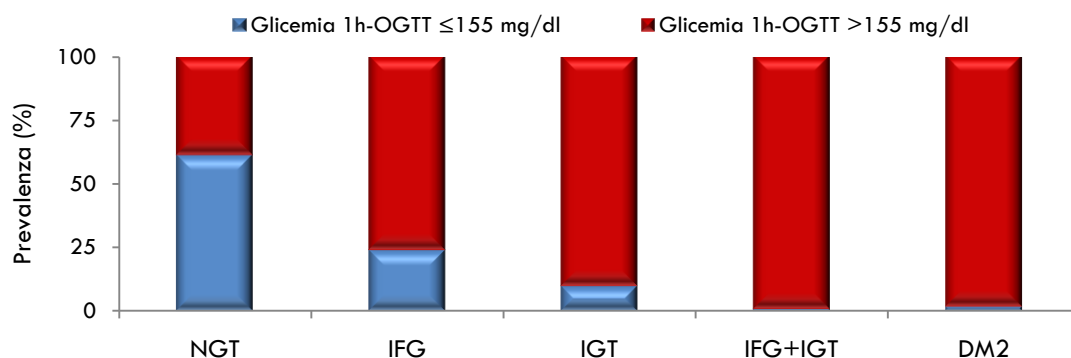


Figura 37. Frequenza del riscontro di valori di glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl nelle differenti classi di regolazione glicemica.

Fra i 474 NGT (37% uomini, 63% donne; età 46 ± 12 anni, BMI 28.4 ± 5.3 Kg/m²), coloro con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl, erano più insulino-resistenti (HOMA-IR 2.72 ± 1.23 vs. 2.68 ± 1.93 ; $p < 0.001$) e mostravano una maggior compromissione della prima fase di secrezione insulinica, come si evince dai più bassi livelli di Indice Insulinogenico (0.05 ± 0.10 vs. 0.03 ± 0.03 ; $p < 0.0001$) e Controllo Derivativo (1381 ± 865 vs. 1721 ± 1384 pmol/m2BSA/mM/min; $p < 0.005$) rispetto ai soggetti con glicemia 1h-OGTT ≤155 mg/dl (Fig. 15). Di conseguenza anche il *Disposition Index* risultava più basso nei soggetti con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl (0.026 ± 0.025 vs. 0.055 ± 0.097 ; $p < 0.0001$) (Fig. 15).

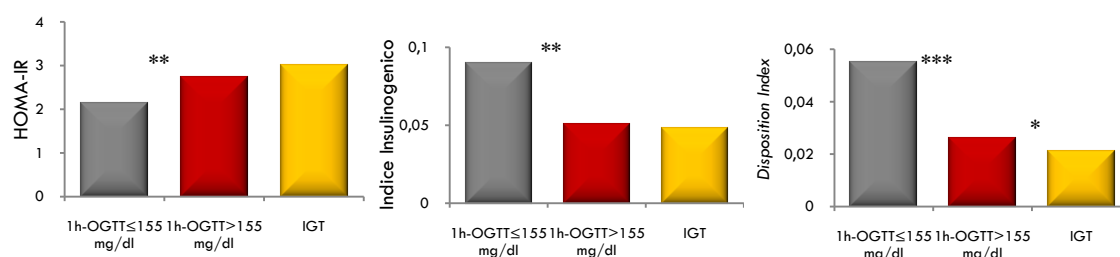


Figura 38. Valori di HOMA-IR, Indice Insulinogenico e *Disposition Index* in relazione ai livelli di glicemia ad 1h-OGTT e confronto con IGT. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

I livelli di HbA1c (5.6 ± 0.4 vs. $5.3 \pm 0.4\%$; $p < 0.0001$), pressione arteriosa (sistolica 128 ± 13 vs. 122 ± 14 mmHg; $p < 0.0001$ e diastolica 81 ± 10 vs. 77 ± 11 mmHg; $p < 0.0001$), colesterolo LDL (136 ± 41 vs. 127 ± 37 mg/dl; $p < 0.05$) e trigliceridi (136 ± 96 vs. 117 ± 75 mg/dl; $p < 0.05$) erano più alti nei soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl, mentre il colesterolo HDL era più basso (52 ± 14 vs. 56 ± 16 mg/dl; $p < 0.005$) rispetto ai soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT ≤155 mg/dl. Rispetto ai

soggetti IGT, gli NGT con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl presentavano un profilo di rischio cardiovascolare simile (Tab. 5), un grado sovrapponibile di IR, ma una funzione β -cellulare lievemente migliore (Fig. 15).

Tabella 15. Profilo di rischio cardiovascolare nei soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl rispetto agli NGT con glicemia 1h-OGTT \leq 155 mg/dl e ai soggetti IGT.

| | NGT con glicemia 1h-OGTT | | IGT | P | |
|---------------------------------------|--------------------------|------------|----------|---------------------------|--------|
| | | | | NGT 1h-OGTT>155 mg/dl | |
| | | | | vs. | |
| | ≤155 mg/dl | >155 mg/dl | | NGT 1h-OGTT ≤155 mg/dl | IGT |
| BMI (Kg/m2) | 28.1±5.3 | 28.9±5.2 | 29.9±5.2 | n.s. | <0.05 |
| Circonferenza vita (cm) | 97±14 | 102±14 | 102±12 | <0.0005 | n.s. |
| Pressione arteriosa sistolica (mmHg) | 122±14 | 128±13 | 133±17 | <0.0001 | <0.005 |
| Pressione arteriosa diastolica (mmHg) | 77±11 | 81±10 | 84±12 | <0.0001 | <0.05 |
| Colesterolo totale (mg/dl) | 206±41 | 210±41 | 213±40 | n.s. | n.s. |
| LDL (mg/dl) | 127±37 | 136±41 | 136±38 | <0.05 | n.s. |
| HDL (mg/dl) | 56±16 | 52±14 | 51±14 | <0.005 | n.s. |
| Trigliceridi (mg/dl) | 117±96 | 136±96 | 155±93 | <0.05 | <0.05 |
| HbA1c (%) | 5.3±0.4 | 5.6±0.4 | 5.7±0.4 | <0.0001 | <0.005 |

- Caratteristiche metaboliche dei soggetti a rischio di diabete tipo 2

I risultati precedentemente illustrati evidenziano il ruolo centrale della perdita della funzione β -cellulare nel peggioramento dell'alterazione della tolleranza glicemica, mentre il contributo dell'IR sembra essere minore. Tuttavia, il contributo dei due fattori può essere altamente variabile e, al fine di valutare il loro ruolo sul profilo metabolico, abbiamo suddiviso l'intera popolazione del GENFIEV in relazione alla presenza di disfunzione β -cellulare e/o IR. Questa arbitraria suddivisione ha portato all'identificazione di 4 differenti gruppi: uno in cui non si osserva alcun difetto, uno con prevalente deficit secretorio, uno caratterizzato prevalentemente da IR e un quarto gruppo che presenta entrambi i difetti. Dalla Tabella 6 si evidenzia che le caratteristiche metaboliche comunemente impiegate per definire la SM variano in relazione al tipo di difetto prevalente.

Tabella 16. Caratteristiche antropometriche e metaboliche nella popolazione dello studio GENFIEV in accordo con la presenza o assenza di deficit secretorio e/o insulino-resistenza

| | Nessun difetto | Deficit β -cellulare | Insulino-resistenza | Deficit β -cellulare + IR | p |
|---------------------------------------|----------------|----------------------------|---------------------|---------------------------------|---------|
| BMI (kg/m ²) | 27 \pm 4 | 29 \pm 5 | 31 \pm 4 | 32 \pm 5 | <0.0001 |
| Circonferenza vita (cm) | 94 \pm 11 | 99 \pm 12 | 107 \pm 12 | 108 \pm 10 | <0.0001 |
| Pressione arteriosa sistolica (mmHg) | 129 \pm 16 | 134 \pm 18 | 135 \pm 15 | 134 \pm 12 | ns |
| Pressione arteriosa diastolica (mmHg) | 80 \pm 10 | 85 \pm 12 | 83 \pm 11 | 85 \pm 10 | <0.01 |
| Colesterolo totale (mg/dl) | 215 \pm 43 | 215 \pm 39 | 224 \pm 38 | 205 \pm 39 | ns |
| LDL (mg/dl) | 139 \pm 40 | 134 \pm 36 | 148 \pm 32 | 131 \pm 44 | ns |
| HDL (mg/dl) | 53 \pm 13 | 54 \pm 17 | 43 \pm 9 | 50 \pm 21 | ns |
| Trigliceridi (mg/dl) | 149 \pm 103 | 130 \pm 73 | 237 \pm 152 | 168 \pm 84 | <0.002 |

Il tratto della SM maggiormente rappresentato era l'ipertensione (63%), seguita da obesità (58%), bassi livelli di colesterolo HDL (34%) e alti trigliceridi (33%), mentre l'iperglicemia a digiuno era la componente meno frequente (21%). In accordo con la definizione NCEP-ATPIII, la prevalenza di SM era 33% (37% negli uomini e 30% nelle donne, $p < 0.0001$) ed aumentava dal 19% negli NGT, a 42% in coloro con IFG, 34% negli IGT, 74% nei soggetti IFG+IGT e 56% nei pazienti con DM2 neo-diagnosticato (Fig. 16).

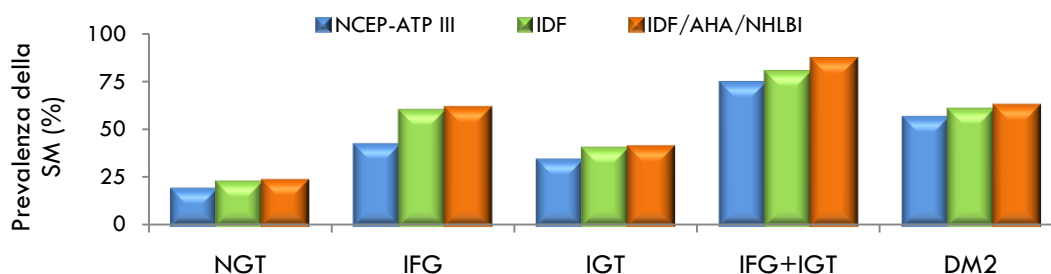


Figura 39. Prevalenza della sindrome metabolica (SM), secondo le diverse definizioni, nelle differenti classi di regolazione glicemica.

Non si osservavano differenze nella prevalenza della SM fra uomini e donne NGT, IGR e DM2. Al fine di verificare se le differenti definizioni della SM potessero influenzarne la prevalenza, la SM è stata valutata anche secondo le definizioni suggerite da IDF e IDF/AHA/NHLBI. Come mostrato in Figura 16, le definizioni IDF e IDF/AHA/NHLBI si associano ad un leggero aumento della prevalenza della (36.5% con IDF e 38.2% con IDF/AHA/NHLBI), in particolare da 22.5% e 23.5% negli NGT a 59% e 61.3% negli IFG, 40% e 41% negli IGT, 79% e 86.8% negli IFG+IGT, 60% e 62.5% nei DM2, rispettivamente.

Le principali caratteristiche antropometriche, cliniche e biochimiche dei soggetti con e senza SM sono riportate nella Tabella 7.

Tabella 17. Principali caratteristiche antropometriche, cliniche e biochimiche dei soggetti con e senza sindrome metabolica (SM). * Mediana (range interquartile).

| | SM+ | SM- | p |
|---------------------------------------|-----------|-----------|---------|
| Soggetti (%) | 292 (33) | 593 (67) | |
| Età (anni) | 60±10 | 46±12 | <0.0001 |
| Circonferenza vita (cm) | 109±11 | 97±14 | <0.0001 |
| BMI (Kg/m ²) | 32±5 | 28±5 | <0.0001 |
| Pressione arteriosa sistolica (mmHg) | 136±15 | 125±14 | <0.0001 |
| Pressione arteriosa diastolica (mmHg) | 87±10 | 79±10 | <0.0001 |
| Glicemia (mg/dl) | 103±14 | 96±14 | <0.0001 |
| Colesterolo totale (mg/dl) | 212±37 | 207±41 | n. s. |
| LDL (mg/dl) | 138±35 | 132±37 | <0.05 |
| HDL mg/dl) | 44±10 | 57±14 | <0.0001 |
| Trigliceridi (mg/dl)* | 178 (103) | 96 (56) | <0.0001 |
| Insulinemia a digiuno (μU/ml) | 16.2±9.6 | 10.2±6.2 | <0.0001 |
| C-peptide a digiuno (ng/ml) | 3.0±1.2 | 2.1±0.9 | <0.0001 |
| HOMA-IR | 4.04±2.8 | 2.27±1.38 | <0.0001 |

La Figura 17 illustra la prevalenza della SM in accordo con la classe di tolleranza glucidica e i livelli di glicemia a digiuno. Questa analisi evidenzia l'effetto della glicemia a 2-h dell'OGTT sulla prevalenza della SM, indipendentemente dalla glicemia a digiuno. Pertanto, con livelli di glicemia a digiuno non diagnostici per SM (<100 mg/dl), la sua prevalenza sale dal 19% negli NGT a 35% negli IGT ($p<0.0001$) e 33% nel gruppo di pazienti con DM2, rispettivamente. Similmente, nei soggetti con IFG (glicemia a digiuno: 100-110 mg/dl) la prevalenza della SM aumentava dal 44% negli NGT al 67% negli IGT e al 69% nei DM2.

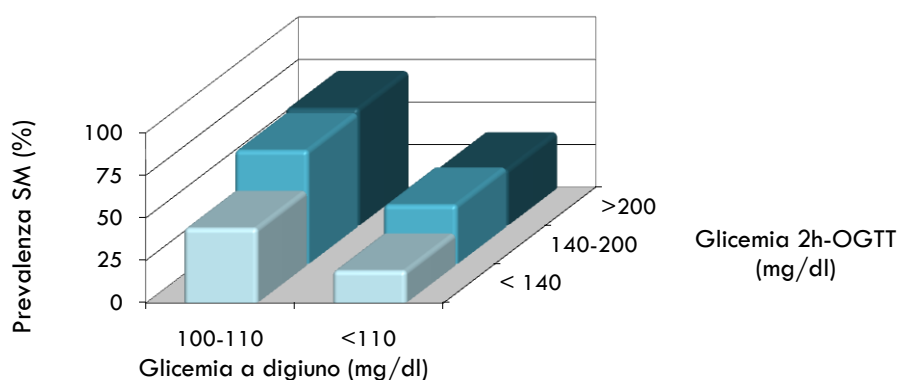


Figura 40. Prevalenza della sindrome metabolica (SM) in accordo con la tolleranza glucidica (glicemia 2h-OGTT) e i livelli di glicemia a digiuno.

Le concentrazioni di insulina e C-peptide a digiuno erano più elevate nei soggetti con SM rispetto a quelli senza SM, ad eccezione dei soggetti IFG (Tab. 7). La presenza di SM non si associava a differenze nell'età, HbA1c e colesterolo totale nelle diverse categorie di IGR. L'IR (HOMA-IR >75° percentile dei soggetti NGT) era più comune nei soggetti IGR rispetto agli NGT (42% vs. 25%; χ^2 , $p<0.0001$), aumentava con il peggiorare della tolleranza glucidica (ANOVA $p<0.0001$). I soggetti con IFG+IGT avevano una più alta prevalenza di IR rispetto ai soggetti con difetto isolato (IFG+IGT, 53%; IFG, 45%; e IGT, 38%; $p<0.0001$). L'IR era anche più frequente nei soggetti con SM rispetto a quelli senza SM (63% vs. 23%, $p<0.0001$). La prevalenza di IR aumentava in accordo con il numero di tratti della SM: 5%, 23%, 39%, 54%, 73% e 88% in presenza di 0, 1, 2, 3, 4 o 5 tratti, rispettivamente (p -trend <0.0001 ; Fig. 18). Nonostante la stretta associazione fra IR e SM, non più del 59% dei soggetti con IR presentava SM.

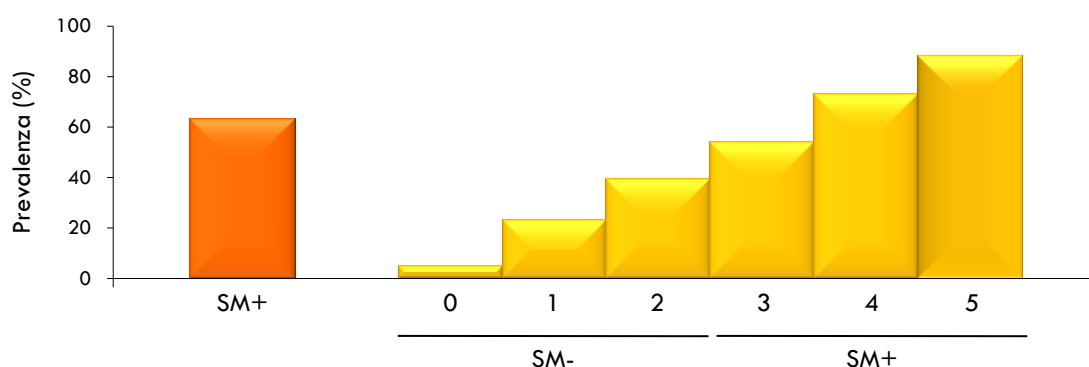


Figura 41. Prevalenza di insulino-resistenza in relazione alla presenza e al grado di severità (numero dei tratti) della sindrome metabolica (SM).

Come atteso, l'andamento dell'Indice Insulinogenico rispecchiava quello dell'indice HOMA-IR così che mentre quest'ultimo progressivamente aumenta con il peggiorare della tolleranza glucidica, il primo si riduce con valori significativamente più bassi in tutti i gruppi IGR rispetto agli NGT (ANOVA $p<0.0001$). Inoltre, non vi erano differenze nell'Indice Insulinogenico fra soggetti con e senza SM in ogni categoria di tolleranza glucidica, mentre l'indice HOMA-IR risultava più elevato nei soggetti con SM (ANOVA $p<0.0001$) (Fig. 19); questa osservazione era valida indipendentemente dalla definizione utilizzata per individuare la presenza di SM (NCEP-ATPIII, IDF o IDF/AHA/NHLBI).

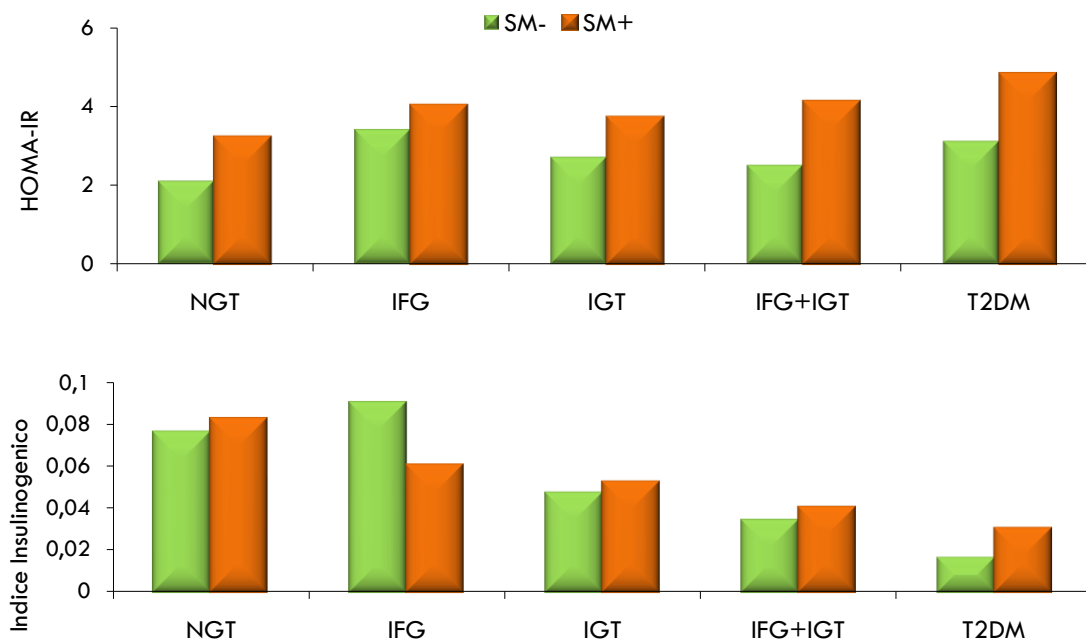


Figura 42. Andamento dell'indice HOMA-IR e dell'Indice Insulinogenico in funzione delle differenti classi di regolazione glicemica e in accordo alla presenza di o assenza di sindrome metabolica (SM).

La maggioranza (70%) dei soggetti con SM era individuate dalla presenza di 3 tratti, mentre il restante 30% dei soggetti con SM presentava più di 3 componenti. L'obesità, l'ipertrigliceridemia e i bassi livelli di colesterolo HDL erano la triade più frequente (>50% of dei casi). AL fine di esplorare la relazione fra tratti della SM e IR, è stato calcolato il potere predittivo per la presenza di IR nelle differenti triplette di componenti della SM. Il più alto potere predittivo nell'identificare i soggetti con IR (50-100%) si riscontrava nelle triplette di tratti che comprendevano l'iperglicemia e/o l'obesità (Fig. 20).

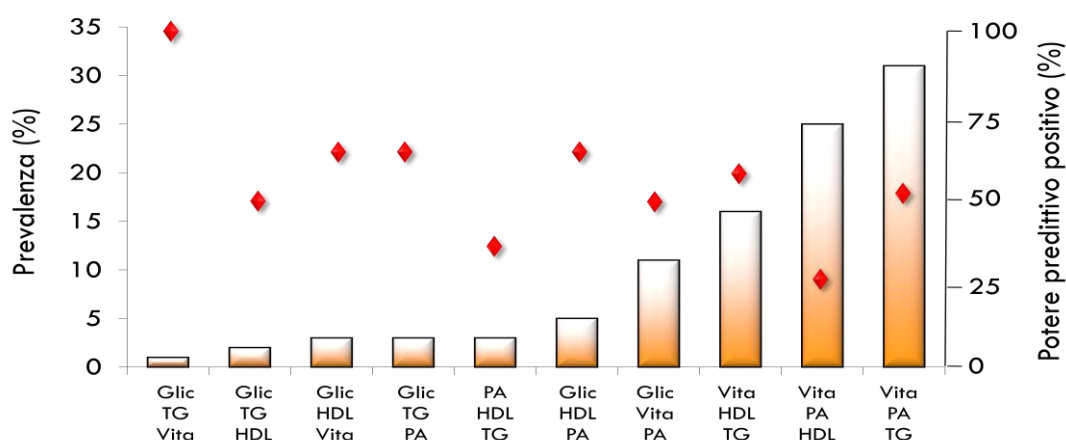


Figura 20. Frequenza delle triplette diagnostiche per sindrome metabolica e rispettivo valore predittivo positivo (rombo rosso) per insulino-resistenza. Glic = glicemia a digiuno, TG = trigliceridi, PA = ipertensione arteriosa

Nei soggetti con IGR, la regressione logistica aggiustata per età e genere, mostrava che l'ipertrigliceridemia (OR 3.38; 95%IC: 2.29-4.99), l'obesità addominale (OR 3.26; 95%IC: 2.18-4.89), l'iperglicemia (OR 3.02; 95%IC: 1.80-5.07) e l'ipertensione (OR 1.69; 95%IC: 1.12-2.55) erano tutti indipendentemente associati all'IR.

- γ -glutamilttransferasi, regolazione glicemica e profilo di rischio cardiovascolare

Questa valutazione è stata effettuata in un sottogruppo di 500 soggetti reclutati nel centro di Pisa. Nell'analisi dei dati sono stati inclusi solo i soggetti (n=489; età 47 ± 11 anni; BMI 28.6 ± 5.5 Kg/m²) con livelli di transaminasi (aspartato-aminotransferasi, AST e alanina-aminotransferasi, ALT) e γ -glutamilttransferasi (γ -GT) <100 U/L, negatività dei test per infezione da HBV e HCV e consumo di alcool <30 g/die. La popolazione in esame è stata suddivisa in quartili di γ -GT e le caratteristiche cliniche confrontate fra quartili.

Tabella 8. Caratteristiche cliniche e biochimiche dei soggetti nei differenti quartili di γ -GT. * Differenze fra I e IV quartile con ANOVA One-way. IGR = impaired glucose regulation. # X² test.

| | γ -glutamilttransferasi | | | | p* |
|--|--------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|----------|
| | I quartile (<14) | II quartile (14-20) | III quartile (21-33) | IV quartile (>33) | |
| Età (anni) | 41 \pm 12 | 48 \pm 11 | 49 \pm 11 | 50 \pm 10 | <0.0001 |
| Fumatori (%) | 17 | 23 | 25 | 18 | n.s. |
| Praticanti attività fisica (%) | 37 | 34 | 33 | 27 | n.s. |
| BMI (Kg/m ²) | 26.9 \pm 6.2 | 27.8 \pm 4.9 | 29.8 \pm 5.0 | 30.0 \pm 5.5 | <0.0001 |
| Circonferenza vita (cm) | 97 \pm 15 | 100 \pm 11 | 104 \pm 12 | 106 \pm 12 | <0.0001 |
| Pressione arteriosa sistolica (mmHg) | 120 \pm 14 | 130 \pm 17 | 129 \pm 14 | 133 \pm 14 | <0.0001 |
| Pressione arteriosa diastolica (mmHg) | 76 \pm 9 | 80 \pm 12 | 81 \pm 12 | 82 \pm 11 | <0.0005 |
| Glicemia a digiuno (mg/dl) | 90 \pm 11 | 97 \pm 14 | 99 \pm 18 | 103 \pm 14 | <0.0001 |
| HbA1c (%) | 5.39 \pm 0.4 | 5.66 \pm 0.5 | 5.73 \pm 0.5 | 5.81 \pm 0.5 | <0.0001 |
| Colesterolo totale (mg/dl) | 195 \pm 0.38 | 211 \pm 40 | 208 \pm 35 | 217 \pm 41 | <0.0001 |
| LDL (mg/dl) | 120 \pm 37 | 135 \pm 37 | 130 \pm 38 | 140 \pm 40 | <0.001 |
| HDL (mg/dl) | 59 \pm 16 | 56 \pm 15 | 54 \pm 23 | 51 \pm 23 | <0.02 |
| Trigliceridi (mg/dl) | 95 \pm 51 | 129 \pm 78 | 167 \pm 183 | 190 \pm 117 | <0.0001 |
| AST (U/L) | 18 \pm 7 | 20 \pm 5 | 22 \pm 6 | 25 \pm 8 | <0.0001 |
| ALT (U/L) | 19 \pm 10 | 23 \pm 9 | 28 \pm 12 | 38 \pm 15 | <0.0001 |
| C-peptide a digiuno (ng/ml) | 1.8 \pm 0.9 | 2.2 \pm 1.0 | 2.5 \pm 1.0 | 2.9 \pm 1.4 | <0.0001 |
| HOMA-IR | 2.18 \pm 1.83 | 3.03 \pm 2.93 | 3.22 \pm 2.07 | 4.33 \pm 3.04 | <0.0001 |
| Disposition Index | 0.041 \pm 0.034 | 0.034 \pm 0.072 | 0.023 \pm 0.021 | 0.017 \pm 0.015 | <0.0001 |
| AUC _{glicemia} (mmol/L/120 min) | 884 \pm 220 | 1015 \pm 253 | 1068 \pm 256 | 1138 \pm 245 | <0.0001 |
| IGR (%) | 21.8 | 44.1 | 48.0 | 63.5 | <0.0001 |
| Sindrome metabolica (%) | 14 | 36 | 39 | 51 | <0.0001# |

I valori medi di BMI, circonferenza vita, pressione arteriosa sistolica e diastolica, glicemia a digiuno, HbA1c, colesterolo totale e LDL, trigliceridi, AST, e ALT aumentavano progressivamente passando dal I al IV quartile di γ -GT e tutti questi parametri erano statisticamente più elevati nel IV quartile rispetto al I quartile, mentre il colesterolo HDL era più basso (Tab. 8). In accordo, la prevalenza di SM era più elevata nel IV quartile rispetto al I (50.8% vs. 13.7%, $p<0.0001$).

Una correlazione positiva si osservava fra livelli di γ -GT e AST ($r=0.36$; $p<0.0001$) e ALT ($r=0.50$; $p<0.0001$).

L'AUC del glucosio e l'indice HOMA-IR aumentavano con l'aumentare dei livelli di γ -GT (ANOVA, $p<0.0001$ per entrambi), mentre il *Disposition Index* si riduceva (ANOVA, $p<0.0001$) (Tab. 8 e Fig. 21).

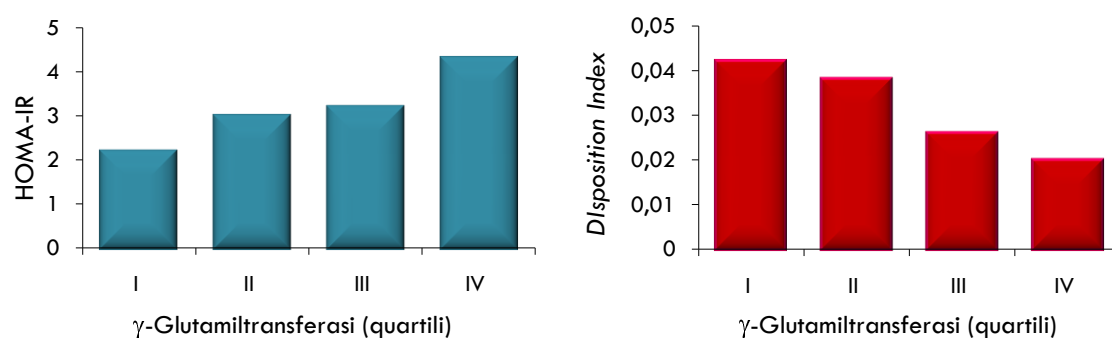


Figura 43. Indice HOMA-IR e *Disposition Index* in funzione dei livelli di γ -Glutamyltransferasi.

In relazione ai risultati dell'OGTT, il 4.5% dei soggetti aveva IFG, 19% IGT, 8% IFG+IGT e il 12.5% DM2. La prevalenza di IGR (IFG, IGT, IFG+IGT) era maggiore nel quartile più alto di γ -GT rispetto al I (IFG 5.9% vs. 4.0%; IGT 22.0% vs. 12.9%; IFG+IGT 12.7% vs. 0.8%; T2DM 22.9% vs. 4.0%; $p<0.0001$). Inoltre, i livelli di γ -GT aumentavano con il deteriorarsi della tolleranza glucidica (21 ± 15 U/L; 28 ± 22 U/L; 27 ± 15 U/L; 32 ± 17 U/L; 34 ± 21 U/L; in NGT, IFG, IGT, IFG+IGT e DM2, rispettivamente; ANOVA, $p<0.0001$).

L'associazione fra quartili di γ -GT e differenti categorie di IGR è stata testata in 3 modelli di regressione logistica multivariata, utilizzando il I quartile come riferimento. Nel Modello 1 i dati sono stati aggiustati per età e genere. Nel Modello 2 anche per familiarità per DM2, fumo, assunzione di alcool, attività fisica e BMI. In fine, anche per AST, ALT e HOMA-IR (Modello 3). Nell'analisi aggiustata per età e genere, il IV quartile

di γ -GT risultava indipendentemente associate IFG+IGT (OR 2.41; 95%IC: 1.13-5.15) e DM2 (OR 2.77; 95%IC: 1.47-5.22). Dopo aggiustamento per familiarità per DM2, fumo, assunzione di alcool, attività fisica e BMI, il IV quartile di γ -GT rimaneva un predittore indipendente di IFG+IGT (OR 2.62; 95%IC: 1.13-6.07) e DM2 (OR 2.39; 95%IC: 1.20-4.76). Queste associazioni si perdevano quando nel modello venivano aggiunti i valori di transaminasi e HOMA-IR (Modello 3). La relazione fra γ -GT (IV quartile) e IFG+IGT prevalente risultava evidente anche negli individui con livelli di AST e ALT all'interno dei valori di normalità ($<45\text{U/L}$), con un OR di 2.47 (95%IC: 1.10-5.52) nel Modello 1 e 2.70 (95%IC: 1.10-6.64) nel Modello 2.

- Effetto dei geni candidati sulla funzione β -cellulare e sulla sensibilità insulinica

Varianti genetiche comuni del TCF7L2 (*Transcription Factor 7-Like 2*) sono state ripetutamente associate ad un aumentato rischio di sviluppare DM2 in differenti popolazioni. Abbiamo pertanto valutato l'associazione del polimorfismo rs7903146 del TCF7L2 con i parametri di regolazione glicemica nell'ambito della popolazione dello studio GENFIEV. Il 16% dei soggetti risultava omozigote per l'allele di rischio T, il 49% era omozigote per l'allele C ed il restante 35% eterozigote (CT). L'allele di rischio T era associato a più alti livelli di glicemia a digiuno e a livelli più bassi di c-peptide a digiuno e a 1h dall'OGTT, HOMA-B e HOMA-IR (Tab. 9).

Tabella 9. Caratteristiche antropometriche e metaboliche dei soggetti portatori dell'allele di rischio (T) del polimorfismo rs7903146 di TCF7L2. * Calcolato dopo trasformazione logaritmica.

| | CC | CT | TT | TT vs CC | P TT vs CT | CT vs CC |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|---------------|----------|
| Soggetti (%) | 35% | 49% | 16% | | | |
| BMI (Kg/m^2) | 29.3 \pm 6 | 29.5 \pm 5 | 27 \pm 5 | 0.0004 | 0.0001 | n.s. |
| Circonferenza vita (cm) | 100 \pm 16 | 100 \pm 13 | 95 \pm 11 | 0.02 | 0.007 | n.s. |
| Glicemia a digiuno (mg/dl) | 93 \pm 12 | 94 \pm 12 | 97 \pm 13 | 0.02 | n.s. | n.s. |
| Glicemia 60 min (mg/dl) | 162 \pm 45 | 167 \pm 45 | 174 \pm 47 | n.s. | n.s. | n.s. |
| C-peptide (ng/ml) | 2.5 \pm 1 | 2.4 \pm 1 | 2.0 \pm 1 | 0.004 | 0.007 | n.s. |
| C-peptide 60 min (ng/ml) | 8.9 \pm 4 | 8.4 \pm 3 | 7.4 \pm 4 | 0.006 | 0.05 | n.s. |
| HOMA-B | 44 \pm 30 | 42 \pm 27 | 29 \pm 18 | $<0.0001^*$ | $<0.0001^*$ | n.s. |
| HOMA-IR | 2.8 \pm 2.3 | 2.7 \pm 1.6 | 2.1 \pm 1.4 | 0.004* | 0.0004* | n.s. |

Osservando la curva glicemica e del C-peptide durante OGTT si evidenzia che i portatori in omozigosi dell'allele T mostravano livelli glicemici più elevati ($p<0.05$ TT vs. CC) e concentrazioni di C-peptide più basse ($p<0.05$ TT vs. CC e TT vs. CT) rispetto agli ai portatori dell'allele C (Fig. 22).

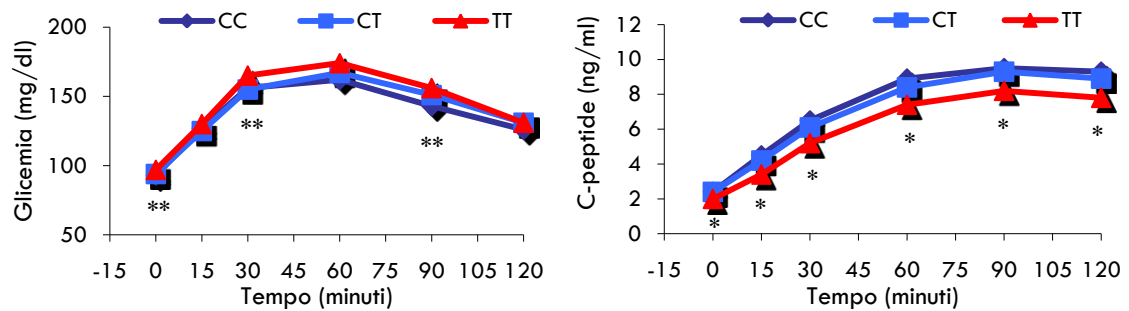


Figura 44. Andamento della glicemia e del C-peptide durante OGTT in relazione al genotipo. ** $p < 0.05$ TT vs. CC. * $p < 0.05$ TT vs. CC e TT vs. CT.

Il deficit della funzione β -cellulare nei portatori dell'allele di rischio è ulteriormente supportata dall'osservazione di bassi livelli del rapporto $AUC_{C-peptide}/AUC_{glucemia}$ nei portatori dell'allele T (CC 0.06 ± 0.02 , CT 0.06 ± 0.02 , TT 0.04 ± 0.02 , $p < 0.0002$).

Inoltre, sulla base del modello minimale, i soggetti omozigoti per l'allele T mostravano una secrezione insulinica basale più bassa (Kruskal-Wallis Test $p < 0.001$) e controllo derivativo ($p < 0.002$) e proporzionale (ANOVA per misure ripetute, $p < 0.05$) peggiori rispetto ai portatori dell'allele C (Fig. 23).

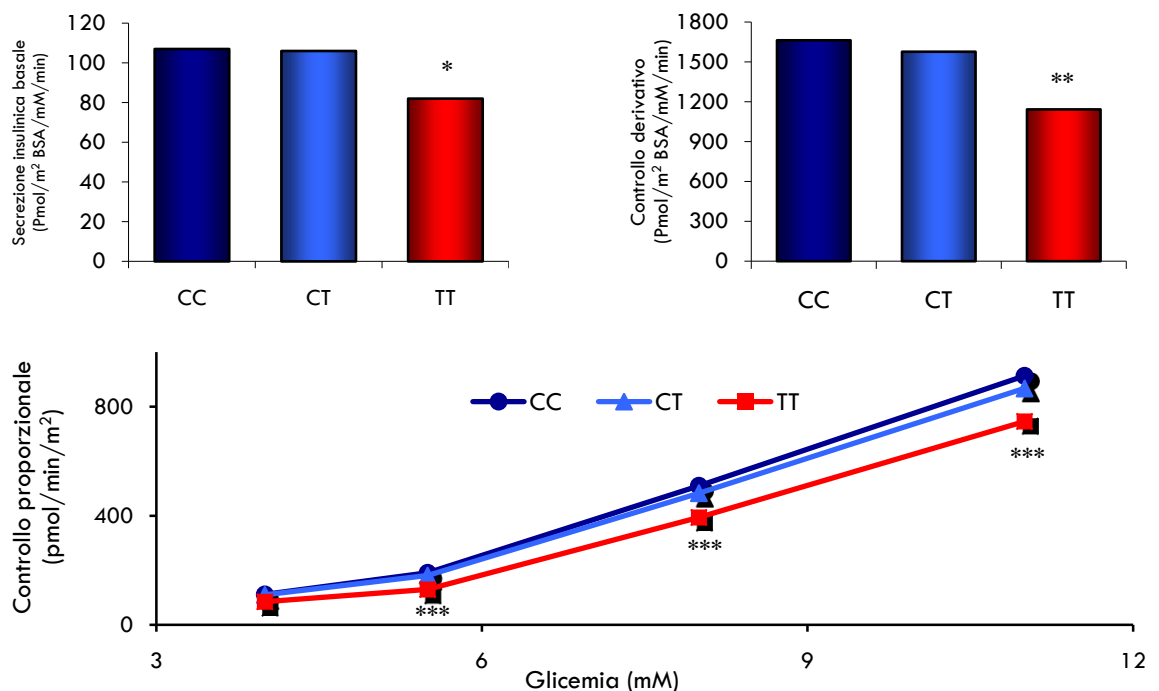


Figura 45. Secrezione insulinica basale, controllo derivativo e proporzionale in funzione del genotipo di TCF7L2. * $p < 0.001$. ** $p < 0.002$. *** $p < 0.05$.

L'alterata funzione β -cellulare sembra essere piuttosto specifica, dato che l'IR risulta essere particolarmente bassa negli omozigoti TT rispetto agli omozigoti CC e agli eterozigoti (HOMA-IR: TT 2.1 ± 1.4 , CC 2.8 ± 2.3 , CT 2.7 ± 1.6 ; $p < 0.005$). La conservata insulino-sensibilità è associata a più bassi livelli di trigliceridi (CC 136 ± 83 , CT 144 ± 106 , TT 113 ± 53 mg/dl, $p < 0.053$) e a livelli più elevati di colesterolo HDL (CC 52 ± 14 , CT 51 ± 14 , TT 58 ± 19 , $p < 0.01$).

Il TCF7L2 è attualmente il gene che conferisce maggior rischio per il DM2, ma gli studi di associazione su tutto il genoma hanno evidenziato numerosi altri geni che possono contribuire al rischio di DM2, seppur con un più basso potere predittivo. Alcune di queste varianti si ritrovano abbastanza comunemente in un certo numero di individui, risultando in un'interazione gene-gene. Nella popolazione del GENFIEV, la variante rs1111875 del gene HHEX/IDE (*Hematopoietically Expressed Homeobox, Insulin Degrading Enzyme*) risultava piuttosto frequente. In particolare l'allele di rischio G era presente in omozigosi nel 38% dei casi ed in eterozigosi nel 47% dei soggetti, mentre il restante 15% risultava omozigote per l'allele A. I portatori in omozigosi dell'allele G non mostrano apparenti differenza nella sensibilità insulinica o nei livelli glicemici e di C-peptide durante OGTT rispetto ai soggetti AG o AA (Tab. 10).

Tabella 10. Caratteristiche antropometriche e metaboliche dei soggetti portatori dell'allele di rischio (G) del polimorfismo rs1111875 del gene HHEX/IDE.

| | AA | AG | GG | P | | |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|----------|----------|----------|
| | | | | GG vs AA | GG vs AG | AG vs AA |
| Soggetti (%) | 15% | 47% | 38% | | | |
| BMI (Kg/m ²) | 30 ± 5 | 29 ± 5 | 29 ± 6 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Circonferenza vita (cm) | 101 ± 14 | 98 ± 13 | 98 ± 15 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Glicemia a digiuno (mg/dl) | 94 ± 11 | 95 ± 13 | 94 ± 12 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Glicemia 60 min (mg/dl) | 164 ± 50 | 167 ± 45 | 166 ± 45 | n.s. | n.s. | n.s. |
| C-peptide (ng/ml) | 2.3 ± 1 | 2.4 ± 1 | 2.2 ± 1 | n.s. | n.s. | n.s. |
| C-peptide 60 min (ng/ml) | 8.5 ± 4 | 8.4 ± 4 | 8.0 ± 4 | n.s. | n.s. | n.s. |
| HOMA-B | 37 ± 20 | 42 ± 29 | 40 ± 26 | n.s. | n.s. | n.s. |
| HOMA-IR | 2.38 ± 1 | 3.0 ± 2 | 2.5 ± 2 | n.s. | n.s. | n.s. |

Anche l'analisi del modello minimale non evidenziava differenze significative nella secrezione di insulina base e nel controllo derivativo fra gli omozigoti per l'allele G e i soggetti AG o AA; si osservava invece una riduzione del controllo proporzionale nei

portatori dell'allele di rischio in omozigosi, rispetto ai portatori dell'allele A (ANOVA misure ripetute, $p < 0.0006$; Fig. 24).

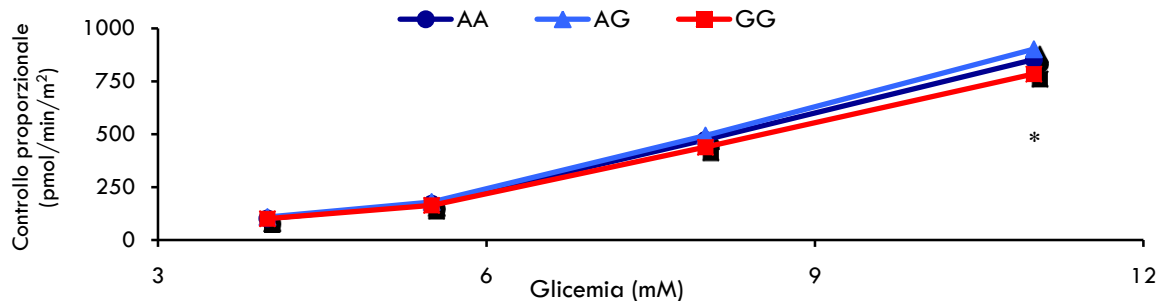


Figura 46. Controllo proporzionale in relazione al genotipo di HHEX/IDE. * $p < 0.0006$.

Considerando l'alta frequenza dell'allele di rischio della variante rs7903146 del TCF7L2 (65%) e della variante rs1111875 del gene HHEX/IDE (85%), abbiamo valutato l'effetto combinato dei due geni. Come mostrato nella Figura 25, i valori della glicemia durante OGTT erano significativamente più bassi nei soggetti che non avevano nessun allele di rischio rispetto a chi ne aveva uno o più (nessun allele di rischio vs. ≥ 1 , $p < 0.05$). Il C-peptide durante OGTT era significativamente più basso solo ad 1h dal carico orale nei portatori di uno o più alleli rischio rispetto a chi non aveva nessun allele di rischio (nessun allele di rischio vs. ≥ 1 , $p < 0.05$).

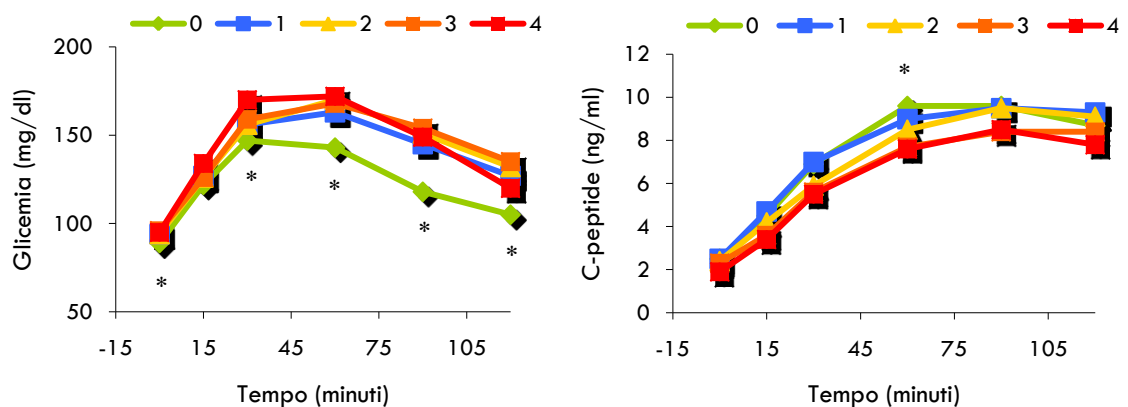


Figura 47. Andamento della glicemia e del C-peptide durante OGTT in funzione del numero di alleli di rischio. * Nessun allele di rischio vs. ≥ 1 , $p < 0.05$.

Con il modello miniale si osservava una progressiva riduzione sia della secrezione insulinica basale (ANOVA misure ripetute, $p < 0.01$), sia del controllo derivativo (ANOVA misure ripetute, $p < 0.01$) con l'aumentare del numero degli alleli di rischio di entrambi i geni (Fig. 26). Un *trend* simile si osservava anche per il controllo proporzionale, ma non si raggiungeva la significatività statistica.

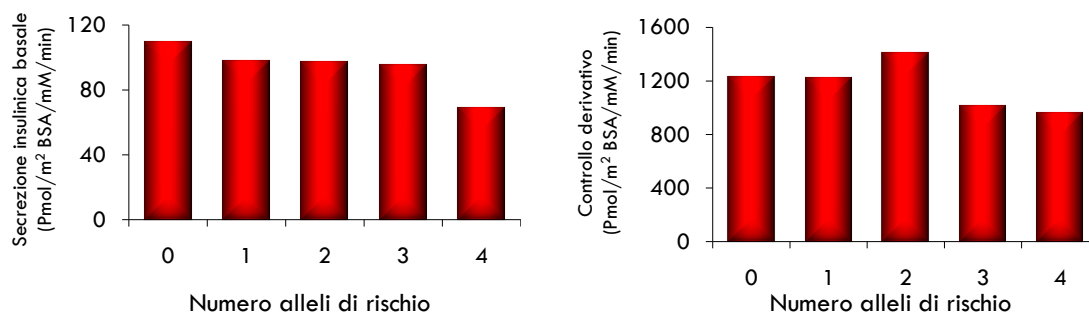


Figura 48. Secrezione insulinica basale in funzione del numero di alleli di rischio.

Discussione

Lo studio GENFIEV è stato intrapreso con l'intento di individuare le caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei soggetti a rischio di DM2, capaci di identificare sottogruppi di individui nei quali applicare efficaci misure preventive. L'analisi trasversale dei dati fino ad ora raccolti ci consente di fare alcune osservazioni di rilievo. Lo studio mostra chiaramente come lo screening opportunistico dei soggetti ritenuti ad alto rischio per DM2 da parte del medico di medicina generale consente di individuare un 15% di soggetti con DM2 non noto e un'ampia percentuale di soggetti con IGR (37%). Tali risultati sono superiori a quelli ottenuti con un approccio di screening di popolazione (17-18). Sebbene questo non fosse un risultato inatteso, è da sottolineare che tale approccio favorisce anche l'identificazione di soggetti ad alto rischio cardiovascolare a causa della concomitante presenza di multipli fattori di rischio nei soggetti con IGR.

L'applicazione del FINDRISC, considerato un valido strumento per individuare i soggetti a rischio di DM2 nell'ambito della popolazione caucasica (19), ha dimostrato anche nell'ambito della popolazione italiana dello studio GENFIEV di essere un utile strumento clinico per l'identificazione dei soggetti con DM2 non noto o IGR. Uno score ≥ 15 mostrava, infatti, una sensibilità nell'identificare soggetti con DM2 non noto del 54% negli uomini e del 63% nelle donne. Nel confronto di questi risultati con quelli osservati nelle due coorti finlandesi in cui il FINDRISC è stato testato, si deve tener conto di alcune differenze. Nello studio finlandese i partecipanti sono stati arruolati in maniera random tra la popolazione generale di età compresa tra 25 e 64 anni. Tale selezione era per poter includere almeno 250 individui per ogni strato, diviso per genere (uomini vs. donne) ed età (decenni tra 25 e 64 anni). Nel GENFIEV, invece, l'arruolamento era su base opportunistica, su segnalazione del medico di medicina generale. Quest'ultima procedura di reclutamento, sebbene più vicina alla comune pratica clinica, può aver portato a selezionare una popolazione a rischio più elevato. Questo è dimostrato, sia pure in maniera indiretta, dalla maggiore prevalenza di soggetti con DM2 non diagnosticato rilevata nel nostro studio (15%) rispetto allo studio finlandese (3.5% nella prima coorte, 5.7% nella seconda coorte). Inoltre, nel questionario finlandese sono state utilizzate 7 domande, con punteggio massimo accumulabile di 20, rispetto ad uno *scoring* a 8 domande, utilizzato nello studio GENFIEV, con punteggio cumulabile massimo di 25. Il fattore di rischio aggiuntivo impiegato nell'ambito della popolazione italiana riguardava la familiarità per il DM2. Nonostante

queste differenze la performance del FINDRISC nell'individuare i soggetti con DM2 sono state molto simili. La sensibilità, cioè la probabilità che il test sia positivo nei soggetti con DM2 rilevato all'OGTT, è risultata 0.76-0.77 nello studio finlandese e 0.57 nello studio italiano. La specificità, cioè la probabilità che il test sia negativo nei soggetti senza DM2 come dimostrato dall'OGTT, è risultata dello 0.66- 0.68 nello studio finlandese e 0.64 nello studio italiano. Il potere predittivo negativo, cioè la probabilità di non avere il DM2 nei soggetti con test di screening negativo, è risultato molto alto in entrambi gli studi. E' quindi possibile concludere che il diabete è relativamente raro nei soggetti con basso score. Il nostro studio ha, inoltre, valutato la performance del FINDRISC quale strumento di screening per i soggetti con alterazioni della tolleranza glucidica intesa (DM2 o IGR), dimostrando una buona sensibilità (52%) e specificità (77%). La performance del FINDRISC nell'identificare i soggetti con IGR è stata valutata anche in un'ampia popolazione finlandese (4.622 soggetti), in cui la prevalenza del DM2 aumentava progressivamente con l'aumentare dello score (20) al pari di quanto osservato nell'ambito dello studio GENFIEV. Lo studio IGLOO (*Impaired Glucose Tolerance and Long-Term Outcomes Observational*), condotto in Italia, ha impiegato il FINDRISC in 1377 soggetti di età 55-75 anni con uno o più fattori di rischio cardiovascolare (21). In questo studio, l'utilizzo dello score come test iniziale, seguito da glicemia a digiuno solo nei soggetti con score > 9 e da OGTT in quelli con glicemia a digiuno compresa tra 100 e 125 mg/dl ha consentito l'identificazione dell'83% dei casi di DM2 e del 57% dei casi di IGT (glicemia a digiuno eseguita nel 64% dei soggetti e OGTT nel 38%). Il *Finnish Diabetes Risk Score*, e una versione semplificata dello stesso, sono stati valutati recentemente anche in Germania in soggetti con storia familiare positiva per SM (22). FINDRISC e OGTT sono stati eseguiti in 771 soggetti e la predizione misurata con ROC-AUC per il FINDRISC verso il DM2 non diagnosticato è risultata pari a 0.81 (0.76-0.87). Infine, il FINDRISC è stato anche valutato quale predittore di eventi cardiovascolari e mortalità per tutte le cause (23). Nel nostro studio, valori più alti del FINDRISC score si associavano ad un progressivo aumento dei livelli dei principali fattori di rischio cardiovascolare e dell'*HeartScore*, algoritmo in grado di stimare nella popolazione europea il rischio a 10 anni di mortalità per eventi cardiovascolari. E' interessante osservare che, proprio uno score ≥ 15 , sembra rappresentare il *cut-off* in grado di identificare, pur nel contesto di una popolazione a rischio cardiovascolare non elevato, i soggetti con un più elevato *HeartScore*. In particolare, i soggetti con FINDRISC score ≥ 15 presentano un *HeartScore* doppio rispetto ai soggetti con FINDRISC score <15.

Lo studio della secrezione e dell'azione dell'insulina nella popolazione del GENFIEV conferma alcune caratteristiche fisiopatologiche dei soggetti con IGR. Infatti, IR e progressiva disfunzione β -cellulare sono molto frequenti nei soggetti con IGR, ma emerge la precocità del deficit secretorio anche in presenza di alterazioni molto modeste della tolleranza glucidica. I parametri dinamici di secrezione insulinica mostrano chiaramente l'esistenza di una marcata alterazione nella capacità delle β -cellule di rispondere alla variazione della glicemia. Tuttavia, il dato più interessante è legato all'osservazione di un progressivo declino della funzione β -cellulare anche nei soggetti con valori glicemici nell'ambito della normalità. L'incremento della glicemia a 2h dall'OGTT da 100 a 140 mg/dl si associa, infatti, ad un declino del 30% della funzione β -cellulare. Anche se non abbiamo ancora la possibilità verificare l'impatto di questa osservazione in senso prospettico, i nostri dati mantengono un loro interesse ed appaiono in linea con quanto osservato nella popolazione del *San Antonio Study* (24). In tale studio, seppur utilizzando differenti metodi di valutazione, Gastaldelli et al hanno evidenziato che la funzione β -cellulare è notevolmente compromessa anche nei soggetti NGT. D'altra parte, gli studi longitudinali hanno mostrato che un 30-40% dei soggetti NGT sviluppa DM2 durante il *follow-up* (13). Potrebbe, pertanto, essere importante identificare nell'ambito dei soggetti NGT coloro che hanno un maggior rischio di sviluppare DM2. In particolare, recenti studi hanno osservato che nei soggetti NGT livelli di glicemia a 1h dall'OGTT >155 mg/dl si associano ad un aumentato rischio di sviluppare DM2 (14-15) e aterosclerosi (16). Nell'ambito della popolazione del GENFIEV, il rilievo di valori di glicemia a 1h-OGTT >155 mg/dl si osservavano con maggior frequenza rispetto a quanto riportato nel *San Antonio Heart Study* e nel *Botnia study* (14-15) (36% vs. 16.7% e 15.9%, rispettivamente), suggerendo che lo screening opportunistico può essere appropriato per comprendere se altri parametri come la glicemia a 1h dell'OGTT possono migliorare l'identificazione dei soggetti a maggior rischio di sviluppare DM2. Abbiamo osservato che il *cut-off point* di 155 mg/dl per la glicemia a 1h-OGTT aveva una buona *performance* nell'individuare i soggetti con IGR o DM2 non noto. Nella popolazione da noi studiata valori di glicemia a 1h dall'OGTT >155 mg/dl si associavano, nei soggetti NGT, ad un iniziale alterazione dell'azione e della secrezione insulinica oltre che ad un peggior profilo di rischio cardiovascolare. Un precedente studio aveva evidenziato che un *cut-off point* di glicemia a 1h dall'OGTT >155 mg/dl era in grado di identificare soggetti NGT con iniziali segni di aterosclerosi carotidea, suggerendo che questo valore di glicemia possa essere utile nell'individuare anche i soggetti NGT a maggior rischio cardiovascolare. E' interessante notare che lo spessore intima-media carotideo osservato negli NGT con glicemia 1h-OGTT

>155 mg/dl era simile a quello misurato nei soggetti IGT e che i due gruppi presentavano un profilo cardiovascolare e metabolico simile. Nel nostro studio si dimostra che i soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl non presentavano differenze nel profilo lipidico e nel grado di obesità addominale rispetto agli IGT, mentre i valori di pressione arteriosa e BMI erano lievemente più bassi. I soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl erano, inoltre, caratterizzati da una maggior IR rispetto agli NGT con glicemia 1h-OGTT sotto il *cut-off point*, ma avevano una sensibilità insulinica simile a quella osservata nei soggetti IGT. Questi risultati sono in accordo con una precedente osservazione in una coorte italiana più piccola (16). La compromissione della prima fase di secrezione insulinica nei soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl potrebbe spiegare la maggior propensione a sviluppare DM2 di questi individui rispetto ai soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT più bassa, come osservato negli studi (14-15). Inoltre, nei soggetti IGT abbiamo descritto un ulteriore peggioramento della secrezione insulinica rispetto ai soggetti NGT con glicemia 1h-OGTT >155 mg/dl. Questa osservazione enfatizza il ruolo centrale del progressivo deterioramento della funzione β -cellulare nel declino della regolazione glicemica. Appare, quindi, chiaro che la perdita della funzione β -cellulare è il vero segna-passi nel peggioramento della tolleranza glicemica, mentre il contributo dell'IR sembra essere meno rilevante. Tuttavia, sebbene il deficit della funzione β -cellulare si accompagna in varia misura con l'IR, spesso con andamento complementare (la secrezione insulinica varia in funzione del grado di insulino-resistenza) (25), il contributo dei due fattori può essere altamente variabile. I dati osservati nel nostro studio suggeriscono, infatti, che, seppur con *cut-off* arbitrari, è possibile identificare, nell'ambito della popolazione a rischio di DM2, soggetti con prevalente deficit della funzione β -cellulare e soggetti che presentano solo insulino-resistenza. In accordo con quanto proposto da Balkau e Ferrannini (26), i due meccanismi potrebbero supportare alterazioni metaboliche specifiche alla base di differenti fenotipi. Osservando, infatti, le caratteristiche fenotipiche dei soggetti IR rispetto a quelle degli individui con deficit secretorio, si evidenzia nei primi un maggior grado di obesità, associato a livelli più elevati di pressione arteriosa diastolica e trigliceridi. Similmente, nello studio EGIR (*European Group for the study of Insulin Resistance*), l'iperinsulinemia e l'IR erano presenti approssimativamente nel 40% del 1308 soggetti non diabetici esaminati, con una sovrapposizione del 60%. Dal confronto dei soggetti che presentavano IR isolata con quelli che avevano solo iperinsulinemia a digiuno apparivano evidenti alcune differenze fenotipiche. In particolare i soggetti con IR avevano una distribuzione più centrale dell'adipe ed avevano lipolisi accentuata e più elevata produzione endogena di glucosio, più alti livelli di pressione arteriosa sistolica e più basse

concentrazioni di colesterolo HDL. Queste caratteristiche fenotipiche configurano, nell'insieme, il quadro di SM, condizione molto comune nell'ambito dei soggetti IGR della popolazione del GENFIEV. La prevalenza di SM è circa doppia rispetto a quella osservata nella popolazione generale italiana (33% vs. 17%) (27). La letteratura riporta una prevalenza della SM nei soggetti con IGR estremamente variabile, soprattutto a causa delle differenti definizioni utilizzate per la diagnosi sia della SM stessa sia delle categorie di tolleranza glucidica. Abbiamo, infatti, osservato che anche nell'ambito della nostra popolazione la prevalenza della SM basata sulla definizione NCEP-ATPIII risultava più bassa rispetto a quella ottenuta con i criteri diagnostici IDF o IDF/AHA/NHLBI (33% vs. 36.5% vs. 38.2%, rispettivamente), differenza largamente spiegata dalla più bassa soglia proposta per la circonferenza vita nei soggetti caucasici nelle ultime due definizioni. Nel *Botnia Study* (28), la SM, definita secondo i criteri dell'OMS era presente nel 10% dei soggetti NGT, nel 50% degli IFG/IGT, e nell'80% dei pazienti con DM2. Nel *Telde study* (18), invece, la diagnosi di SM si basava sui criteri IFD e la prevalenza era 13.2% negli NGT, 57.2% nei soggetti con IFG isolata (glicemia a digiuno <100 mg/dl), 64.4% in coloro che avevano solo IGT, e 75.6% nel gruppo IFG+IGT. In tutti i casi l'IGR appare associata con un più alto tasso di SM, indipendentemente dall'etnia e dall'influenza geografica. In tutte le attuali definizioni per la SM si basano sulla valutazione della glicemia a digiuno, ma recenti evidenze hanno suggerito che la glicemia post-OGTT potrebbe migliorare la capacità diagnostica (29-30). Anche nel nostro studio, quando è stata considerata la glicemia a 2h-OGTT, la prevalenza della SM aumentava del 50%. D'altra parte, l'IR peggiorava progressivamente con il deteriorarsi della tolleranza glicemica e in presenza di SM, indipendentemente dalla definizione utilizzata per classificarla. Simili risultati sono stati osservati anche in soggetti Giapponesi (31) e Koreani (32), ma, a differenza di quanto osservato in questi studi, nella popolazione GENFIEV l'impatto della SM sull'IR era presente anche nei soggetti NGT. Poiché l'IR è comunemente associata ad iperinsulinemia compensatoria, abbiamo valutato le concentrazioni di insulina e C-peptide a digiuno nei differenti gruppi di IGR in relazione alla presenza di SM ed abbiamo osservato che esse erano più elevate in tutti i gruppi di IGR in presenza di SM. Tuttavia, non si osservavano differenze nell'Indice Insulinogenico, a indicare che anche nei soggetti ad alto rischio per DM2 è l'IR, più che il deficit secretoria, ad essere associato alla SM. D'altra parte, l'IR è una caratteristica tipica dei soggetti con IGR (33), sebbene nel nostro studio siano state osservate alcune differenze tra le diverse categorie di disglycemia, i soggetti IFG+IGT sembrano essere caratterizzati da un maggior grado di IR. Numerosi autori (34-36) hanno riportato un aumento dell'IR nei soggetti IFG, IGT e IFG/IGT, mentre Heldgaard et al. (37)

non hanno evidenziato differenze fra IFG e IGT in termini di IR. Nel *Botnia Study* (38), così come nel *RIAD study* (39), l'IR era più evidente nei soggetti IFG che negli IGT. Nel *Telde study* (18) tutte le categorie di IGR presentavano un maggior grado di IR rispetto agli NGT. Tali discrepanze possono essere spiegate dalle differenti caratteristiche delle popolazioni studiate. L'IR, quindi, non solo caratterizza gli stati di IGR, ma predice lo sviluppo di DM2 (40-41) e di patologie cardiovascolari (42-44) e sembra giocare un ruolo centrale nella patogenesi della SM (45), dato che è frequente l'associazione fra stima dell'IR, SM e sue componenti (46). E' stato, infatti, osservato che nei soggetti non diabetici, la prevalenza della SM e delle sue componenti aumenta in funzione dell'IR (47). Nello studio di Brunico (17), nei soggetti con disordini metabolici multipli la prevalenza di IR era 95.2% e si riduceva al 42% nei soggetti sovrappeso senza altri disordini metabolici. Risultati simili sono stati riportati dall'EGIR: circa il 20% dei soggetti sovrappeso con disordini metabolici multipli presentava IR (valutata mediante clamp euglicemico iperinsulinemico) (48). Utilizzando i criteri NCEP-ATPIII, uno studio più recente, ha mostrato che approssimativamente i 2/3 dei soggetti con SM sono anche IR (49). In accordo con questi studi, abbiamo osservato, nell'ambito della popolazione del GENFIEV, una relazione fra IR e prevalenza e severità (espressa come numero delle componenti) della SM nei soggetti IGR. Dalla nostra analisi emerge, però, che poco meno della metà dei soggetti IR non soddisfa i criteri per la SM e che circa il 40% dei soggetti con SM non sono IR, suggerendo che l'IR potrebbe essere il fattore sottostante più comune nella SM, ma non necessariamente il solo. Nel valutare questi risultati si deve comunque considerare che l'IR nel nostro studio è stata arbitrariamente definita per valori di HOMA-IR >75° percentile della distribuzione dell'indice nei soggetti NGT. E' anche vero, però, che non esiste una definizione universale o un chiaro *cut-off* per identificare tale condizione. L'implicazione di queste osservazioni è che altri meccanismi potrebbero rendere conto del *clustering* delle componenti della SM come, per esempio, l'obesità viscerale (50) o l'infiammazione (51), tutti elementi considerati predittori non solo di DM2, ma anche di patologie cardiovascolari, al pari della SM (52). L'idea che i classici fattori di rischio cardiovascolare potessero essere associati all'IR è stata proposta da Reaven nella famosa *Banting lecture* del 1988 (53), ma egli stesso in tempi più recenti ha sottolineato che un sostanzioso numero di soggetti che non soddisfa i criteri NCEP-ATPIII diagnostici per la SM potrebbe essere IR e pertanto da ritenere a rischio cardiovascolare (54). E, d'altra parte, i criteri diagnostici della SM non necessariamente riescono ad identificare tutti i soggetti IR (54). Tre studi hanno valutato la relazione fra IR e criteri NCEP-ATPIII della SM in soggetti non-diabetici (55-57). In tutti gli studi i criteri NCEP-ATPIII hanno mostrato una bassa sensibilità nell'identificare la presenza di IR, misurata con

clamp euglicemico iperinsulinemico, test di soppressione insulinica modificato (*steady-state* della concentrazione plasmatica di glucosio) o modello minimale. Nello studio di Cheal et al. (55) l'obesità (valutata come BMI) e il profilo lipidico risultavano le misure in grado di identificare meglio i soggetti IR. Recentemente Sierra-Johnson (57) e colleghi hanno dimostrato che la misura della circonferenza vita era il criterio diagnostico più accurato per l'individuazione dei soggetti IR. Nella nostra popolazione iperglicemia, ipertrigliceridemia e obesità, così come l'ipertensione, erano tutti predittori indipendenti di IR. Inoltre, le triplete diagnostiche per la SM che comprendevano iperglicemie e/o obesità avevano il più alto potere predittivo nell'identificare i soggetti IR fra i soggetti con IGR. Questa osservazione potrebbe, però, essere spiegata dal fatto che elevati livelli di glicemia a digiuno sono frequenti nei soggetti a rischio di DM2 e che l'obesità era altamente prevalente nella nostra popolazione.

Negli ultimi anni, parallelamente all'interesse crescente per alcuni aspetti cellulari, genetici e molecolari potenzialmente associati all'insorgenza e alla progressione della malattia diabetica e delle sue complicanze cardiovascolari, si sono accumulate numerose informazioni su possibili "nuovi" marcatori biologici. Ad esempio, i livelli sierici di γ -GT, l'enzima responsabile del catabolismo extracellulare del glutatione (GSH, γ -glutamyl-cisteinil-glicina), il principale agente antiossidante intracellulare delle cellule umane (58), sono stati proposti sia come biomarcatori dello stato infiammatorio (59) sia come indice di stress ossidativo (60) e sono stati associati a sviluppo di DM2 e patologie cardiovascolari (61-62). Pertanto, abbiamo valutato l'associazione fra γ -GT, IGR e parametri di IR e secrezione insulinica in un sottogruppo di soggetti reclutati per lo studio GENFIEV. I livelli di γ -GT erano più elevati, seppur sempre nel *range* di normalità, nei soggetti con IGT e la prevalenza delle differenti categorie di IGR aumentavano in funzione dei livelli di γ -GT. Tale associazione era confermata anche nell'analisi multivariata. Dopo aggiustamento per potenziali confondenti, i livelli di γ -GT rimanevano indipendentemente associati a IFG+IGT e DM2 neo-diagnosticato, anche se il contributo indipendente dei livelli di γ -GT si perdeva quando nel modello venivano inserite anche le transaminasi. Si deve, tuttavia, notare che esisteva una forte correlazione fra γ -GT e gli altri enzimi epatici. L'associazione con alcune categorie di IGR era già stata descritta in alcuni studi. Ad esempio, il *Mexico City Diabetes Study* (63) aveva riportato un'associazione fra livelli di γ -GT e IGT incidente e prevalente (OR 1.8, 95%CI 1.2-2.8) e, più recentemente, livelli di γ -GT più elevati sono stati descritti nei soggetti con glicemia a digiuno compresa fra <5.55 e

6.9 mmol/L nella popolazione di Taiwan (64). In un sottogruppo di donne non-diabetiche del *British Women's Health and Heart Study* (65), è stato evidenziato un aumento delle concentrazioni di HbA1c, insulina e glicemia a digiuno nei terzi di distribuzione di ALT e γ -GT (p -trend <0.001). Allargando queste osservazioni, nel nostro studio abbiamo evidenziato che i soggetti nel più alto quartile di distribuzione di γ -GT si caratterizzavano per livelli più elevati di glicemia a digiuno, HbA1c e AUC_{glicemia}, oltre che per una peggior sensibilità insulinica e *performance* β -cellulare. Una relazione fra γ -GT e IR era stata precedentemente riportata negli Indiani Pima (66-67), una popolazione ad caratterizzata da una marcata alterazione dell'azione insulinica e da un'alta prevalenza di DM2 (68). Tuttavia, in questo gruppo etnico le concentrazioni basali di γ -GT non differivano fra soggetti NGT e IGT e, in un'analisi longitudinale, fra individui che sviluppavano o non sviluppavano DM2 (69). Inoltre, non si osservava alcuna associazione fra γ -GT e variazioni nella risposta insulinica acuta o nei livelli di insulinemia a digiuno. Questi risultati appaiono in contrasto con le nostre osservazioni circa la relazione inversa fra livelli di γ -GT e *performance* β -cellulare in soggetti a rischio di DM2. Tuttavia, oltre alle differenze etniche, altri fattori potrebbero spiegare tali discrepanze, incluse le differenze nei metodi utilizzati per valutare l'azione e la secrezione insulinica, così come il tipo di studio: longitudinale negli Indiani Pima, trasversale nel nostro caso. I meccanismi responsabili dell'associazione fra γ -GT e IGR sono solo parzialmente noti. Le concentrazioni di γ -GT sono comunemente impiegate come indice di consumo d'alcool e/o di malattie epatiche (70), ma né l'abuso di alcool né la disfunzione epatica sembrano essere responsabili dell'associazione osservata fra γ -GT e IGR/DM2. Elevati livelli di γ -GT potrebbero riflettere l'accumulo di lipidi nel fegato, come spesso accade in presenza di IR (71) e/o DM2 (72-73). Noi non disponiamo di osservazioni dirette (ad esempio uno studio di *imaging*) sulla steatosi epatica nella nostra popolazione. Ciononostante, considerando la correlazione fra transaminasi e steatosi (74), possiamo ipotizzare che la relazione osservata fra γ -GT e IGR sia indipendente dalla steatosi epatica, dato che si osserva anche nei soggetti che hanno livelli di AST e ALT nel *range* di normalità. A supporto di tale possibilità è l'osservazione che il potere predittivo dei livelli di γ -GT si perde quando nel modello vengono considerate anche le transaminasi. Risultati simili sono stati riportati anche in uno studio prospettico sull'incidenza del DM2 (75). Un altro meccanismo che potrebbe spiegare la relazione fra γ -GT e IGR è che la γ -GT potrebbe riflettere un sottostante processo infiammatorio. E' noto, infatti, che uno stato infiammatorio cronico di basso grado e lo stress ossidativo partecipano a più livelli alla patogenesi del

DM2, come suggerito, ad esempio, dallo studio CARDIA (*Coronary Artery Risk Development in Young Adults*) (76-77). I livelli sierici di γ -GT potrebbero quindi essere un biomarcatore dello stato infiammatorio (78). A sostegno di questo punto di vista, l'associazione descritta in letteratura fra γ -GT e PCR (79). D'altra parte, l'insorgenza e la progressione del DM2 sono state correlate anche allo stress ossidativo (80) dovuto al danneggiamento del DNA e alla riduzione della protezione anti-ossidante (81). E' interessante notare che modeste alterazioni del metabolismo glucidico, come negli stati di IFG e IGT, sono sufficienti a generare stress ossidativo, comportando danni a carico del DNA cellulare. Questo processo potrebbe contribuire alla disfunzione β -cellulare pancreatica, all'IR e, quindi, alla progressione dell'iperglicemia verso il DM2 conclamato (82). Poiché la γ -GT gioca un ruolo centrale nel sistema antiossidante con funzione primaria nel mantenimento delle concentrazioni di glutathione intracellulare, critiche nei processi di difesa delle cellule, elevati livelli di γ -GT potrebbero riflettere una risposta di difesa allo stress ossidativo (83). Infine, l'esposizione cronica agli xenobiotici ambientali, come gli inquinanti organici, potrebbe fornire un altro potenziale legame fra livelli di γ -GT e DM2 (84). Una stretta relazione dose-risposta fra concentrazione sierica di xenobiotici e prevalenza del DM2 è stata riscontrata nel *National Health and Nutrition Examination Survey Metabolism* (85). Livelli di γ -GT normali-alti, in tal caso, potrebbero riflettere la quantità di glutathione coniugato formatosi durante il metabolismo di inquinanti organici. Infine, le concentrazioni sieriche di γ -GT sono state associate anche le patologie cardiovascolari (86-87). In accordo con precedenti studi (62, 88-89), anche nell'ambito della nostra popolazione abbiamo osservato che i livelli più alti di γ -GT si accompagnavano ad un profilo di rischio cardiovascolare peggiore, caratterizzato da livelli più elevati di glicemia, trigliceridi, colesterolo LDL e pressione arteriosa, oltre che da più bassi livelli di colesterolo HDL e più alta prevalenza di SM.

Le caratteristiche finora descritte delineano ampiamente il fenotipo dei soggetti a rischio di DM2. Esse sono influenzate da ben noti fattori ambientali, ma anche da determinanti genetiche, non completamente note. Nelle popolazioni europee, gli studi GWA (*Genome-Wide Association*) (90-95) hanno dimostrato che TCF7L2 è il più importante locus predisponente al DM2 e tale osservazione è stata confermata in differenti gruppi etnici. Abbiamo, pertanto, valutato se la variante del gene TCF7L2, precedentemente descritta in studi caso-controllo e di coorte (96-99), potesse aggiungere ulteriori informazioni in una popolazione come quella del GENFIEV, già preselezionata con uno screening opportunistico. I nostri risultati evidenziano che la frequenza dell'allele di rischio del

polimorfismo rs7903146 di TCF7L2 è elevata nei soggetti ad alto rischio di DM2 ed appare più elevata rispetto a quella degli studi precedenti (93, 100-102), forse ad indicare una maggiore suscettibilità al DM2 in relazione all'area geografica di origine (Fig. 26).

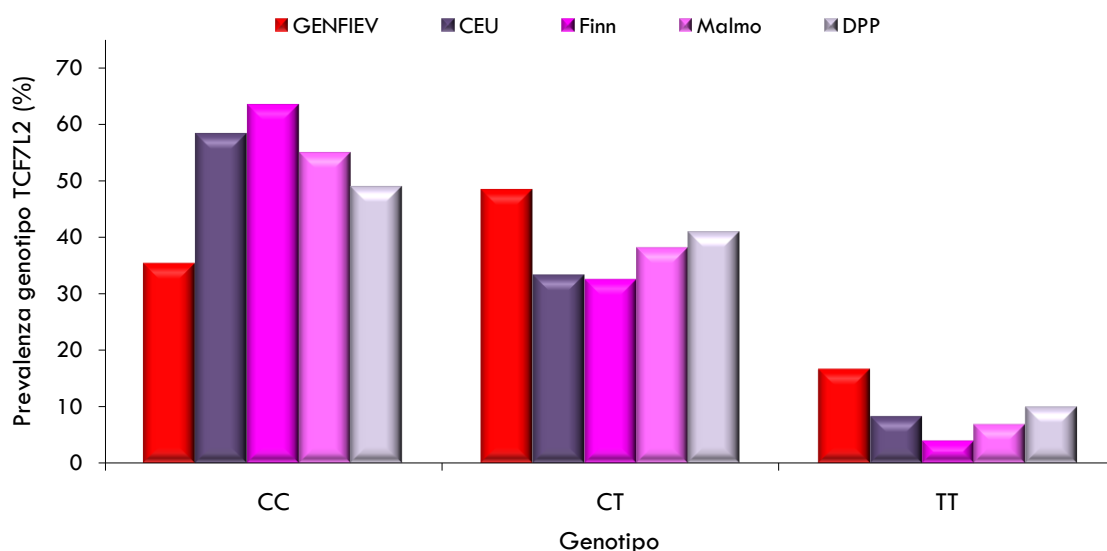


Figura 49. Frequenza del genotipo di TCF7L2 in diverse popolazioni.

A livello individuale, lo stato di portatore dell'allele di rischio di TCF7L2 incrementa il rischio di diabete del 50%, mentre a livello di popolazione il rischio attribuibile è inferiore al 25% e varia con la frequenza allelica (101). I risultati della genotipizzazione della popolazione del GENFIEV confermano che la principale alterazione associata con l'allele di rischio T di rs7903146 del TCF7L2 è rappresentata da un difetto della secrezione insulinica. D'altra parte i portatori dell'allele di rischio appaiono più insulino-sensibili rispetto ai portatori dell'allele C, come documentato dai più bassi livelli di indice HOMA-IR e, dal un punto di vista fenotipico, da più bassi livelli di BMI, circonferenza addominale e trigliceridi e da più alti livelli di colesterolo HDL. Le stime di secrezione insulinica usate negli studi di associazione non hanno finora permesso di individuare un difetto specifico a livello della funzione β -cellula. Al contrario, nella nostra popolazione, è stata osservata un'alterazione basale, acuta e globale. Tale dato potrebbe sembrare inatteso ma, al tempo stesso, potrebbe essere una conseguenza dei criteri di selezione impiegati al momento dell'arruolamento. In particolare, se l'allele T comporta una riduzione della secrezione insulinica ed un elevato rischio di DM2, i soggetti nei quali coesiste anche insulino-resistenza

è probabile siano quelli che hanno DM2 di nuova diagnosi, cioè quelli esclusi dall'analisi di associazione con le variabili fenotipiche. D'altra parte, i soggetti a rischio portatori dell'allele T potrebbero non aver ancora manifestato la malattia proprio a causa del minor grado di IR, probabilmente secondaria ad altri fattori, sia genetici sia ambientali. In entrambi i casi, i nostri risultati confermano che la variante rs7903146 di TCF7L2 può portare allo sviluppo di DM2 compromettendo la secrezione insulinica. Così come KCNJ11, TCF7L2 sembra essere un gene associato a DM2 il cui polimorfismo comune coinvolge primariamente la β -cellula (100, 103-105). Quali siano i meccanismi responsabili della disfunzione β -cellulare nei portatori dell'allele di rischio di TCF7L2 non sono ancora completamente chiari. È stato suggerito che, nei portatori dell'allele di rischio, possa essere presente una riduzione della secrezione del peptide glucagone-simile 1 (GLP-1, la cui trascrizione è regolata da TCF7L2) da parte delle cellule entero-endocrine (99). Potrebbe, quindi, essere presente un ridotto effetto delle incretine (GLP-1 ma anche GIP), con conseguente ridotta secrezione di insulina dopo il pasto (106). In aggiunta o in alternativa a questo meccanismo potrebbero esserci difetti nel processamento dell'insulina (107). Infatti, uno dei bersagli di TCF7L2 è il gene HHEX, che si trova in una regione genica che comprende anche i geni KIF11 (per il *Kinesin-Interacting Factor*) e IDE (*Insulin Degrading Enzyme*). In alternativa, poiché TCF7L2 fa parte del segnale WNT (108), una via implicata nella proliferazione cellulare, nella motilità e nello sviluppo del pancreas e delle isole durante la crescita dell'embrione, si può presumere un effetto sulla massa β -cellulare, sullo sviluppo delle β -cellule, così come sulla funzione stessa della β -cellula (109). L'importanza della via del segnale WNT nell'omeostasi glucidica è stata ulteriormente sottolineata da dati recenti che indicano che varianti comuni della regione del cromosoma 10q contenente HHEX, anch'esso target del segnale WNT (ma anche altri geni candidati: KIF11 e IDE), sono associate a rischio di DM2 (90-94). Nella popolazione del GENFIEV, l'allele di rischio della variante rs1111875 del gene HHEX/IDE era molto frequente (85%), ma non si associava a particolari alterazioni della secrezione o dell'azione dell'insulina. Tuttavia, quando si considerava l'effetto combinato degli alleli di rischio della variante rs1111875 del gene HHEX/IDE e della variante rs7903146 del TCF7L2 si osservava un progressivo peggioramento della funzione β -cellulare con l'aumentare del numero degli alleli di rischio, suggerendo che l'interazione gene-gene possa influenzare il difetto fenotipico. Anche se il background genetico è un requisito pre-necessario allo sviluppo del DM2, esso può spiegare solo una piccola parte del rischio. In due recenti pubblicazioni è stato contemporaneamente dimostrato che anche mettendo insieme più di 15 varianti geniche per

calcolare uno *score* genetico, esso non supera i classici fattori di rischio nella predizione del DM2 (110-111). Questa osservazione sottolinea la complessità dell'interazione gene-gene e gene-ambiente nel determinismo della malattia.

Conclusioni

- Gli algoritmi di rischio basati su criteri clinici rappresentano uno strumento efficace per la predizione del DM2. Tale capacità predittiva può essere migliorata con l'uso di biomarcatori di rischio non tradizionali.
- La caratterizzazione clinica e fisiopatologica dei soggetti a rischio di DM2 può contribuire ad identificare gruppi di individui a rischio più elevato.
- Il deficit di secrezione insulinica rappresenta l'alterazione metabolica caratteristica della condizione di disglycemia.
- Nell'ambito dei soggetti ad alto rischio di DM2 ma con normale regolazione glicemica è possibile identificare un deficit della funzione β -cellulare correlato a valori glicemici più elevati già nelle fasi precoci del carico orale di glucosio.
- Nella popolazione italiana il TCF7L2, uno dei geni di rischio candidati, risulta altamente prevalente fra i soggetti con alterazioni della regolazione glucidica e si associa al difetto della funzione β -cellulare. Gli effetti epistatici di altri geni possono potenziare le azioni del TCF7L2 a livello β -cellulare.
- L'identificazione di soggetti a rischio di DM2 può contribuire a ridurre l'impatto di tale condizione sul rischio cardiovascolare.

Bibliografia

1. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2010; 87: 4-14
2. Gillies CL, Abrams KR, Lambert PC, Cooper NJ, Sutton AJ, Hsu RT, Khunti K. Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 334(7588): 299
3. Simpson RW, Shaw JE, Zimmet PZ. The prevention of type 2 diabetes-lifestyle change or pharmacotherapy? A challenge for the 21st century. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 59: 165-80
4. Saaristo T, Peltonen M, Lindstrom J, Saarikoski L, Sundvall J, Eriksson JG. Cross-selection evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score: a tool to identify undetected type 2 diabetes, abnormal glucose tolerance and metabolic syndrome. *Diab Vasc Dis Res* 2005; 2: 67-72
5. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197
6. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497
7. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome-a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059-1062
8. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640-1645
9. Purves RD. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J Pharmacokin Biopharm* 1992; 20: 211-227
10. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419
11. Tura A, Kautzky-Willer A, Pacini G. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;72:298-301
12. Bergman RN, Ader M, Huecking K, Van Citters G. Accurate assessment of β -cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes* 2002; 51 (Suppl. 1):S212-S220
13. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KGMM. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycemia: the current status on definition and intervention. *Diabetes Med* 2002;19:708-723
14. Abdul-Ghani MA, Abdul-Ghani T, Ali N, Defronzo RA. One-hour plasma glucose concentration and the metabolic syndrome identify subjects at high risk for future type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:1650-1655
15. Abdul-Ghani MA, Lyssenko V, Tuomi T, Defronzo RA, Groop L. Fasting versus post-load plasma glucose concentration and the risk for future type 2 diabetes: results from The Botnia Study. *Diabetes Care* 2009;32:281-286

16. Succurro E, Marini MA, Arturi F, Grembiale A, Lugarà M, Andreozzi F, Sciacqua A, Lauro R, Hribal ML, Perticone F, Sesti G. Elevated one-hour post-load plasma glucose levels identifies subjects with normal glucose tolerance but early carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 207(1): 245-249
17. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Muggeo M, Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes* 1998; 47: 1643-1649
18. Novoa FJ, Boronat M, Saavedra P, Diaz-Cremades JM, Varillas VF, La Roche F, Alberiche MP, Carrillo A, Differences in cardiovascular risk factors, insulin resistance, and insulin secretion in individuals with normal glucose tolerance and in subjects with impaired glucose regulation: the Telde Study. *Diabetes Care* 2005; 28: 2388-2393
19. Schwarz PE, Li J, Lindstrom J, Tuomilehto J. Tools for predicting the risk of type 2 diabetes in daily practice. *Horm Metab Res.* 2009; 41(2):86-97
20. Saaristo T, Peltonen M, Lindström J et al. Cross-sectional evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score: a tool to identify undetected type 2 diabetes, abnormal glucose tolerance and metabolic syndrome. *Diabetes Vasc Dis Res* 2005; 2:67-72
21. Franciosi M, De Berardis G, Rossi MC, Sacco M, Belfiglio M, Pellegrini F, Tognoni G, Valentini M, Nicolucci A. Use of the diabetes risk score for opportunistic screening of undiagnosed diabetes and impaired glucose tolerance: the IGLOO (Impaired Glucose Tolerance and Long-Term Outcomes Observational) study. *Diabetes Care* 2005;28(5): 1187-1194
22. Li j et al. A more simplified Finnish Diabetes Risk Score for opportunistic screening of undiagnosed type 2 diabetes in a German population with a family history of a metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2009; 41(2):98-103
23. Lindstrom J, Tuomilehto J, Silventoinen K et al. The validity of the Finnish Diabetes Risk Score for the prediction of the incidence of coronary heart disease and stroke, and total mortality. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005; 12(5): 451-458
24. Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA; San Antonio metabolism study. Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio metabolism (SAM) study. *Diabetologia* 2004; 47: 31-39
25. Bergman RN, Finegood DT, Kahn SE. The evolution of beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 Suppl 3: 35-45
26. Ferrannini E, Balkau B. Insulin: in search of a syndrome. *Diabet Med* 2002; 19: 724-729
27. Miccoli R, Bianchi C, Odoguardi L, Penno G, Caricato F, Giovannitti MG, Pucci L, Del Prato S. Prevalence of the metabolic syndrome among Italian adults according to ATP III definition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 250-254
28. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2001;24:683- 689
29. Rodriguez A, Muller DC, Engelhardt M, Andres R, Contribution of impaired glucose tolerance in subjects with the metabolic syndrome: Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Metabolism* 2005; 54: 542-547
30. Kanauchi M, Kanauchi K, Kimura K, Inoue T, Saito Y, Utility of elevated 2-hour postload plasma glucose as an alternative to elevated fasting glucose as a criterion for the metabolic syndrome. *Metabolism* 2006; 55: 1323-1326
31. Mori Y, Hoshino K, Yokota K, Itoh Y, Tajima N, Japanese IGT subjects with high insulin response are far more frequently associated with the metabolic syndrome than those with low insulin response. *Endocrine* 2006; 29: 351-355

32. Rhee SY, Chon S, Oh S, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Woo JT, Insulin secretion and insulin resistance in newly diagnosed, drug naive prediabetes and type 2 diabetes patients with/without metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 76: 397-403
33. Reaven GM, Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607
34. Davies MJ, Raymond NT, Day JL, Haless CN, Burden AC, Impaired glucose tolerance and fasting hyperglycaemia have different characteristics. *Diabet Med* 2000; 17: 433-440
35. Carnevale Schianca GP, Rossi A, Sainaghi PP, Maduli E, Bartoli E, The significance of impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance: importance of insulin secretion and resistance. *Diabetes Care* 2003; 26: 1333-1337
36. Williams JW, Zimmet PZ, Shaw JE, de Courten MP, Cameron AJ, Chitson P, Tuomilehto J, Alberti KG, Gender differences in the prevalence of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance in Mauritius. Does sex matter? *Diabet Med* 2003; 20: 915-920
37. Heldgaard PE, Olivarius N, Hindsberger C, Henriksen JE, Impaired fasting glycaemia resembles impaired glucose tolerance with regard to cardiovascular risk factors: population-based, cross-sectional study of risk factors for cardiovascular disease. *Diabet Med* 2004; 21: 363-370
38. Tripathy D, Carlsson M, Almgren P, Isomaa B, Taskinen MR, Tuomi T, Groop LC, Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: lessons from the Botnia Study. *Diabetes* 2000; 49: 975-980
39. Hanefeld M, Koehler C, Henkel E, Fuecker K, Schaper F, Temelkova-Kurktschiev T, Post-challenge hyperglycaemia relates more strongly than fasting hyperglycaemia with carotid intima-media thickness: the RIAD Study. *Diabet Med* 2000; 17: 835-840
40. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR, Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 1990; 113: 909-15
41. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 1993; 329: 1988-1992
42. Yip J, Facchini FS, Reaven GM, Resistance to insulin-mediated glucose disposal as a predictor of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2773-2776
43. Haffner SM, D'Agostino R Jr, Mykkanen L, Tracy R, Howard B, Rewers M, Selby J, Savage PJ, Saad MF, Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 1999; 22: 562-568
44. Bonora E, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, Saggiani F, Poli M, Perbellini S, Raffaelli A, Cacciatori V, Santi L, Targher G, Bonadonna R, Muggeo M, HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2002; 25: 1135-1141
45. Hanley AJ, Karter AJ, Festa A, D'Agostino R Jr, Wagenknecht LE, Savage P, Tracy RP, Saad MF, Haffner S; Insulin Resistance Atherosclerosis Study, Factor analysis of metabolic syndrome using directly measured insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 2002; 51: 2642-2647
46. DeFronzo RA, Ferrannini E, Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-194
47. Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI, The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 108-113
48. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G, on behalf of the European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), Insulin resistance and hypersecretion in obesity. *J Clin Invest* 1997; 100: 1166-1173

49. Cheal KL, Abbasi F, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Ford ES, Relationship to insulin resistance of the adult treatment panel III diagnostic criteria for identification of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004; 53: 1195–1200
50. Després JP, Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 2006; 38: 52-63
51. Das UN, Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 989-997
52. Saely CH, Aczel S, Marte T, Langer P, Hoefle G, Drexel H, The metabolic syndrome, insulin resistance, and cardiovascular risk in diabetic and nondiabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5698-5703
53. Reaven GM, Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607
54. Reaven GM, Insulin resistance, cardiovascular disease, and the metabolic syndrome. How well do the emperor's clothes fit? *Diabetes Care* 2004; 27: 1011-1012
55. Cheal KL, Abbasi F, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Ford ES, Relationship to insulin resistance of the adult treatment panel III diagnostic criteria for identification of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004; 53: 1195–1200
56. Liao Y, Kwon S, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, Jenkins AJ, Klein RL, Garvey WT, Critical evaluation of adult treatment panel III criteria in identifying insulin resistance with dyslipidemia. *Diabetes Care* 2004; 27: 978 –983
57. Sierra-Johnson J, Johnson BD, Allison TG, Bailey KR, Schwartz GL, Turner ST, Correspondence between the adult treatment panel III criteria for metabolic syndrome and insulin resistance. *Diabetes Care* 2006; 29: 668-672
58. Paolicchi A, Domenici S, Pieri L et al. Glutathion catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1029-37
59. Ortega E, Koska J, Salbe AD, Tataranni PA, Bunt JC. Serum γ -glutamyl transpeptidase is a determinant of insulin resistance independently of adiposity in Pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91: 1419-1422
60. Emdin M, Pompella A, Paolicchi A. Gamma-Glutamyltransferase, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease Triggering Oxidative Stress Within the Plaque. *Circulation* 2005; 112:2078-2080
61. Monami M, Bordini G, Lamanna C, Pala L, Cresci B, Francesconi P, Buiatti E, Rotella CM, Mannucci E. Liver enzymes and risk of diabetes and cardiovascular disease: results of the Firenze Bagno a Ripoli (FIBAR) study. *Metabolism* 2008;57:387-92
62. Kim DJ, Noh JH, Cho NH et al. Serum γ -glutamyltransferase within its normal concentration range is related to the presence of diabetes and cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 2005; 22:1134–1140
63. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, Posadas R, Williams K, Haffner SM, Stern MP, Ferrannini E; Mexico City diabetes study. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 2005; 28:1757–1762
64. Hsiao JY, Wang CL, Hsia PJ, Hsieh MC, Hsin SC, Lin KD, Shin SJ: Decreased insulin secretion and insulin sensitivity are associated with liver function in subjects with fasting glucose between 100 and 109 mg/dL in Taiwanese population. *Pancreas* 2007; 35:343-347
65. Fraser A, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. A comparison of associations of alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase with fasting glucose, fasting insulin, and glycated 153transferrin in women with and without diabetes. *Hepatology* 2007; 46:158-165
66. Yokoyama H, Hirose H, Moriya S, Saito I. Significant correlation between insulin resistance and serum γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activity in non-drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26:91S–94S

67. Ortega E, Koska J, Salbe AD, Tataranni PA, Bunt JC. Serum γ -glutamyl transpeptidase is a determinant of insulin resistance independently of adiposity in Pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1419-1422
68. Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev* 1990; 6:1-27
69. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1889-1895
70. Teschke R, Brand A, Strohmeyer G. Induction of hepatic microsomal gamma-glutamyltransferase activity following chronic alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 75:718-724
71. Marchesini G, Forlani G. NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology* 2002; 35:497-499
72. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50:1844-1850
73. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35:373-379
74. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:437-443 Kerner A, Avizohar O, Sella R, Bartha P, Zinder O, Markiewicz W, Levy Y, Brook GJ, Aronson D. Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein. Possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 193-197
75. Lee DH, Jacobs Jr DR, Gross M, Steffers M. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003; 49:1358-1366
76. Lee DH, Steffen LM, Jacobs DR. Association between serum gamma-glutamyltransferase and dietary factors: CARDIA study. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:600-605
77. Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, Marsik C, MacAllister RJ, Wolzt M. Inflammation-induced vasoconstrictor hyporeactivity is caused by oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1656-1662
78. Ortega E, Koska J, Salbe AD, Tataranni PA, Bunt JC. Serum γ -glutamyl transpeptidase is a determinant of insulin resistance independently of adiposity in Pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91: 1419-1422
79. Lee DH, Jacobs DR Jr. Association between serum gammaglutamyltransferase and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005; 178: 327-330
80. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab. Res. Rev* 2001; 17, 189-212
81. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000; 26: 163-176
82. Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, Sun X, Liu L. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112:599-606

83. Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE. Expression of g-glutamyl transpeptidase protects Ramos B cells from oxidation-induced cell death. *J Biol Chem* 2001;276:3798–804
84. Lee DH, Steffes MW, Jacobs DR Jr. Can persistent organic pollutants explain the association between serum gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes? *Diabetologia* 2008; 51:402-407
85. Lee DH, Lee IK, Song K, Steffes M, Toscano W, Baker BA, Jacobs DR Jr.. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care*. 2006;29:1638-1644
86. Ruttman E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H, Vorarlberg Health Monitoring and Promotion Program Study Group. Gamma glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiologic investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation* 2005; 112: 2130-2137
87. Jousilahti P, Rastenyte D, Tuomilehto J. Serum gamma-glutamyl transferase, self-reported alcohol drinking, and the risk of stroke. *Stroke* 2000; 31:1851–1855
88. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum gamma-Glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004; 27:1427-1432
89. Miura K, Nakagawa H, Nakamura H, Tabata M, Nagase H, Yoshida M, Kawano S. Serum gamma-glutamyl transferase level in predicting hypertension among male drinkers. *J Hum Hypertens* 1994; 8:445–449
90. Sladek R, Rochelau G, Rung J et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445: 828-830, 881-885
91. Diabetes Genetics Initiative (Saxena R, Voigt B, Lyssenko V et al.): Genome wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007; 316: 1331-1336
92. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007; 316: 1336-1341
93. Scott L, Moehlke K, Bonnycastle LL et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007; 316: 1341-1345
94. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2007; 39: 770-775
95. The Wellcome Trust Case Control Consortium: Genome-wide association study of 14000 cases of seven common disease and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447; 661-678
96. Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, Sprau AG, Jackson AU, Narisu N, Duren WL, Chines PS, Stringham HM, Erdos MR, Valle TT, Tuomilehto J, Bergman RN, Mohlke KL, Collins FS, Boehnke M. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* 2006; 55: 2649-2653
97. Helgason A, Palsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, Gunnarsdottir S, Adeyemo A, Chen Y, Chen G, Reynisdottir I et al. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet* 2007, 39: 218-225
98. Saxena R, Gianniny L, Burtt NP, Lyssenko V, Giorducci C, Sjögren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, Lindblad U, Daly MJ, Tuomi T, Hirschhorn JN, Ardlie KG, Groop LC, Altshuler D. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 2006; 55: 2890-2895
99. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006; 38: 320-323

100. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PIW, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D, for the Diabetes Prevention Program Research Group. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 2006; 355: 241-250
101. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426:789-796
102. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjögren M, Ling C, Eriksson KF, Lethagen L, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, Del Prato S, Groop L Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes *J Clin Invest.* 2007; 117(8): 2155–2163
103. Munoz J, Lok KH, Gower BA, Fernandez JR, Hunter GR, Lara-Castro C et al. Polymorphism in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with reduced insulin secretion in non-diabetic women. *Diabetes* 2006, 55: 3630-3634
104. Marzi C, Huth C, Kolz M, Grallert H, Meisinger C, Wichmann HE et al. Variants of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) are strongly associated with type 2 diabetes but not with the metabolic syndrome in the MONICA/KORA surveys. *Horm Metab Res* 2007; 39: 46-52
105. Freathy RM, Weedon MN, Bennett A, Hypponen E, Relton CL, Knight B et al Type 2 diabetes TCF7L2 risk genotypes alter birth weight: a study of 24053 individuals. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 1150-1161
106. Schafer SA, Tschrirter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, Holst JJ, Dekker JM, T'Hart LM, Nijpels G, van Haefen TW, Haring HU, Fritsche A. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia* 2007; 50: 2443-2450
107. Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, Schafer SA, Tschrirter O, Staiger H, Stefan N, Haring HU, Fritsche A. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia* 2008; 51: 597-601
108. Smith U TCF7L2 and type 2 diabetes – we WNT to know- commentary. *Diabetologia* 2007; 50: 5-7
109. Papadopoulou S, Edlund H Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. *Diabetes* 2005; 54: 2844-2851
110. Meigs JB, Shrader P, Sullivan LM, McAteer JB, Fox CS, Dupuis J, Manning AK, Florez JC, Wilson PW, D'Agostino RB Sr, Cupples LA. Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359: 2208-2219
111. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, Nilsson P, Groop L. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359: 2220-2232

Pharmacological intervention in prediabetes: considering the risks and benefits

S. Del Prato, C. Bianchi, R. Miccoli and G. Penno

Department of Endocrinology and Metabolism, Section of Metabolic Diseases and Diabetes, University of Pisa, Pisa, Italy

The impact of the diabetes epidemic will be staggering in terms of costs to individuals and society. Social educational initiatives are imperative to altering the lifestyle trends that drive the growth of the epidemic. Targeted lifestyle or drug interventions aimed at preventing progression from prediabetes to type 2 diabetes mellitus carry costs and risks that need to be considered in the context of expected benefits, which also need to be carefully defined. In terms of pharmacological intervention as part of a primary prevention programme, the risk/benefit assessment must include the potential for adverse effects in a large population of asymptomatic individuals, a significant proportion of whom would not progress to diabetes in the absence of treatment and in whom impaired glucose regulation may reflect different underlying pathogenetic mechanisms. Improving the balance of risks and benefits in drug interventions will require a greater ability to determine which treatments are likely to safely improve glucose regulation and prevent diabetes and its adverse cardiovascular outcomes in individual patients.

Keywords: epidemic, pharmacology, prevention, type 2 diabetes

Received 2 July 2007; revised version accepted 16 July 2007

It is proper at the present time to devote time not alone to treatment but still more to prevention of diabetes. The results may not be so striking or immediate, but they are sure to come and to be important – Elliot P. Joslin, 1921

Introduction

The tools needed to identify individuals at risk for type 2 diabetes mellitus (T2DM) are available and the time to implement them is now. Approximately 190 million people worldwide currently are estimated to have diabetes; it is predicted that >360 million will have the condition by 2030, with approximately 90% having T2DM [1,2].

With such a striking increase in the worldwide prevalence of diabetes, the prospect of the accompanying increase in the number of individuals developing diabetes-associated complications is a considerable concern. Microvascular and macrovascular complications of the disease are heavy burdens for individual patients and for healthcare systems [3,4].

There is evidence indicating that both lifestyle interventions and drug treatments can substantially reduce risk of progression to T2DM in high-risk individuals (table 1). Lifestyle change, though absolutely necessary if the current trend in T2DM is to be reversed, is difficult to implement and maintain. For drug treatment, the benefits of

Correspondence:

Stefano Del Prato, MD, Department of Endocrinology and Metabolism, Section of Diabetes, Ospedale Cisanello, via Paradisa, 2, 56124 Pisa, Italy.

E-mail:

delprato@immr.med.unipi.it

Conflict of interest statement:

S. D. P. received an unrestricted educational grant from Novartis Pharma AG for the development of this article; has acted as a paid consultant to Novartis Pharma AG, Merk Sharpe and Dohme and GSK; and has spoken at symposia organised by these companies. All other authors have no conflicts of interests.

Table 1 Evidence for preventing diabetes [7,8,11–19]

| Study | Drug or intervention | Subject at risk | Risk reduction |
|------------------------|-------------------------------|--|----------------|
| Lifestyle modification | | | |
| Da Quing [7] | Group diet/exercise | IGT | –42 |
| DPP [13] | Individual diet, exercise | IGT, BMI ≥ 24 kg/m ² , FPG >5.3 (95) | –58 |
| DPS [8,19] | Individual diet, exercise | IGT, BMI ≥ 25 kg/m ² | –58 |
| Non-thiazolidinediones | | | |
| DPP [13] | Metformin (1700 mg) | IGT, BMI >24 kg/m ² , FPG >5.3 | 31 |
| IDPP [14] | Metformin (500 mg) | IGT | 26 |
| IDPP [14] | Metformin + lifestyle | IGT | 28 |
| STOP-NIDDM [15] | Acarbose (300 mg) | IGT, FPG >5.6 | 25 |
| XENDOS [18] | Orlistat (120 mg) + lifestyle | Normal (79%) or IGT (21%), BMI ≥ 30 kg/m ² | 37 |
| Thiazolidinediones | | | |
| DPP [16] | Troglitazone (400 mg) | IGT, BMI >24 kg/m ² , FPG >5.3 | 75 |
| TRIPOD [17] | Troglitazone (400 mg) | Previous GDM | 50 |
| DREAM [12] | Rosiglitazone (8 mg) | IGT or IFG | 62 |

DPP, diabetes prevention programme; DPS, diabetes prevention study; IDPP, Indian DPP; STOP-NIDDM, study to prevent non-insulin-dependent diabetes; XENDOS, xenical in the prevention of diabetes in obese subjects; TRIPOD, troglitazone in prevention of diabetes; DREAM, diabetes reduction assessment with ramipril and rosiglitazone medication; IGT, impaired glucose tolerance; BMI, body mass index; FPG, fasting plasma glucose; GDM, gestational diabetes mellitus; IFG, impaired fasting glucose.

prevention need to be weighed against the risks of adverse effects in a setting in which drugs will have to be chronically administered in a population of people who otherwise are relatively healthy and without symptoms.

Societal Intervention

Why is T2DM spreading so rapidly? The rising tide of diabetes is driven in large part by a lifestyle that includes inactivity and high-calorie diets and results in a growing prevalence of obesity [1,5]. T2DM is increasing among children and adolescents [6] growing up in cultures, whether impoverished or not, that support these types of lifestyle. Lifestyle modification that involves diet and exercise has proven effective in reducing the rate of progression from impaired glucose tolerance (IGT) to T2DM in Asian, European and American populations [7–9]. For example, the Finnish Diabetes Prevention Study showed a 58% reduction in risk of progression from IGT to T2DM with a diet and exercise programme that was amenable to use in community medical practices [8].

Although approaches targeting high-risk individuals have been proven successful, it is clear that broader educational prevention strategies are needed if public health is truly valued. Such societal interventions might include educational/prevention strategies directed at the community, the use of formal and structured programmes on lifestyle as part of school curricula and other ways of exposing young people to the disaster and mayhem of diabetes [10].

Even more drastic measures could be envisaged, such as some sort of penalty for commercial practices that encourage a lifestyle associated with a burgeoning major

public health disaster (e.g. the manufacture, use or sale of high-fat/high-calorie foods) [10].

Diabetes prevention strategies include screening, diagnosis, and then specific lifestyle or drug interventions in high-risk individuals or groups. In addition to the studies showing benefits of lifestyle intervention, several trials also have shown significant effects of drug treatment in reducing progression to T2DM in high-risk subjects [11]. For example, the Diabetes Prevention Program (DPP) trial showed a 31% risk reduction with metformin treatment (as compared to a 58% reduction with lifestyle intervention) in subjects with IGT [9]. More recently, the Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication (DREAM) trial showed a 60% reduction in progression with rosiglitazone treatment in subjects with IGT or impaired fasting glucose (IFG) [12].

However, when considering screening programmes to identify subjects at risk for T2DM with the intention of intervening with either lifestyle changes or drug therapy, implications of such programmes in large asymptomatic populations need to be considered. Some of these implications have to do with the potential adverse effects of screening, including 'labelling' of asymptomatic individuals as having a disease that requires intervention and also the risk of potential false-positive diagnoses. Other considerations include costs for screening, treatment and follow-up. The costs and consequences of poor compliance with lifestyle or drug interventions also need to be considered. In addition, the potential adverse effects of drug treatment need to be evaluated in the context of long-term treatment in an asymptomatic population. In order to elaborate on the risk/benefit ratio, results from

available prevention trials will be discussed for the sake of speculation.

Risks and Benefits of Preventive Drug Therapy

Of all drugs used in prevention trials, glitazones have been the only ones matching results obtained with lifestyle modification (table 1) [7,8,11–19]. As implementation and maintenance of lifestyle modification may be a difficult and costly task, drugs providing similar protection might be considered for wide use in people at risk of T2DM. However, glitazones are not free of side effects, including oedema and risk of congestive heart failure and most recently noted, bone fracture in menopausal women.

Along with the 60% reduction in risk for progression to T2DM over 3 years observed with rosiglitazone treatment in the DREAM trial, there was a trend towards a greater incidence of cardiovascular events. A significantly greater rate of confirmed heart failure occurred in the rosiglitazone arm vs. the placebo arm (0.5 vs. 0.1%) [12]. Given the risk reduction and confirmed heart failure rate with rosiglitazone in the trial, it can be estimated that of every 1000 individuals with IGT treated, T2DM would be prevented in 144 subjects and heart failure would occur in 4 persons.

Although the attributable risk of heart failure might seem small in comparison with the 60% preventive benefit, it needs to be taken into account that in a population of individuals with IGT, only approximately one-third will progress to T2DM over 10 years, with one-third reverting to normal glucose tolerance and another third maintaining IGT. The question then becomes whether heart failure is occurring in those individuals in whom diabetes is prevented or in individuals who derive no preventive benefit from treatment (either because they developed diabetes or would not have irrespective of treatment). It can be seen that the risk associated with treatment is different if it is framed in terms of 4 cases of heart failure in 144 persons in whom T2DM and its sequelae were prevented or in terms of 4 cases of heart failure in the subpopulation of asymptomatic individuals who were never going to develop T2DM.

For the sake of speculation, let us consider the case of Italy, in which there are an estimated 3 million individuals with IFG and/or IGT. If all would receive glitazone treatment for 3 years, T2DM would be prevented in 432 000 individuals and treatment-related heart failure would occur in 12 000 individuals. On the conservative assumption that one-quarter of individuals developing heart failure are those who would have reverted to normal glucose tolerance, 3000 otherwise healthy people would

experience treatment-related heart failure. Whether such risk is acceptable is an issue that needs to be confronted in considering pharmacological diabetes prevention programmes, and such risk/benefit calculations must be part of the dialogue on this issue.

The benefits of T2DM prevention with drug treatment also need to be more specifically delineated, although it is clear that expected benefits include reduction in cardiovascular disease. A heated debate has stemmed from the recent meta-analysis suggesting that rosiglitazone may actually increase the risk of myocardial infarction [20]. Although the significance of results of a meta-analysis based on short-term studies with few cardiovascular events is questionable, a strongly benign safety profile must characterize any drug potentially useful for diabetes prevention.

Both higher-than-optimal blood glucose itself and T2DM are associated with increased risk for cardiovascular disease. Epidemiological and experimental data suggest that glucose excursion may be associated with cardiovascular risk [21], so that control of postprandial hyperglycaemia, the most common characteristic of prediabetes, might lead to wider benefits in terms of reducing such risk.

In the Study TO Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes (STOP-NIDDM), the α -glucosidase inhibitor acarbose, which acts to reduce postprandial glucose levels, was used in IGT patients in an attempt to reduce conversion towards T2DM. Acarbose treatment was associated with a 25% reduction in risk of progression over 3.3 years in individuals with a single-positive oral glucose tolerance test (OGTT) and a 36% reduction in those with two consecutive positive OGTT results [15]. In addition to reductions in HbA1c, fasting plasma glucose and 2-h postprandial plasma glucose, acarbose treatment was associated with small but significant reductions in triglycerides and blood pressure. The overall metabolic improvement was unexpectedly associated with significant reductions in new cases of hypertension (34% reduction), myocardial infarction (91% reduction) and any cardiovascular event (49% reduction) [22]. While we await confirmation of these interesting results, questions must be asked regarding how to interpret risks and benefits with drugs that may have a lower effect on progression to T2DM, but a significant reduction of cardiovascular outcomes.

Both risks and benefits of drug treatment to prevent T2DM will become more clearly understood when the population likely to respond to a given intervention is better defined. Although it would be ideal to be able to include accurate genotyping in the decision-making process regarding who should be treated and what intervention should be used, for now it is important to attempt

to understand the different phenotypes of IGT or impaired glucose regulation in targeting drug therapy as this may improve the risk/benefit ratio. Thus, in the DPP trial, the risk reduction for diabetes progression obtained with metformin was greatest in individuals with higher body mass index [9], a finding similar to that reported with rosiglitazone treatment in DREAM [12] (figure 1). Thus, it may well be that insulin-sensitizing agents have a preferential role in reducing risk in obese individuals.

In tailoring treatment, it needs to be taken into account that development of T2DM reflects the pathogenetic interaction of insulin resistance and β -cell dysfunction, and that the contribution of these mechanisms may differ among individuals with impaired glucose tolerance or regulation. Interesting information on this issue will be available as soon as the results of the ongoing Nateglinide and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research (NAVIGATOR) will be published [23]. In a 2X2 factorial trial design, more than 7000 IGT subjects are currently treated with nateglinide, valsartan, the combination, or placebo, with effects on progression to T2DM being assessed after 3 years and effects on cardiovascular event rates being assessed after the occurrence of 1000 cardiovascular events (estimated 69 months). Nateglinide is a rapid-acting agent that stimulates early-phase insulin secretion to reduce postprandial hyperglycaemia, while valsartan, like other angiotensin II receptor blockers, has been shown to reduce incident T2DM in post-hoc analyses of clinical trials [24].

When addressing maintenance of β -cell function, the progressive nature of the defect in insulin secretion must be considered. Loss of β -cell mass and function are evi-

dent already in IGT subjects and continue through development of T2DM, as opposed to insulin resistance, which tends to plateau.

The incretin-based approaches to improving glucose regulation may offer some hope of reversing or maintaining β -cell mass and function. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors can maintain sustained elevation in circulating levels of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). This peptide has powerful effects on β -cell function and survival. As shown in figure 2, treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin resulted in increased β -cell replication and reduced apoptosis and, thus, increased β -cell mass in the neonatal rat pancreatic growth model [25,26]. In studies in human T2DM islet cells, the glucagon-like peptide-1 mimetic exendin-4 produced improvements in insulin release and insulin stimulation index. It also resulted in significantly higher expression of genes active in regulating β -cell function, including the insulin, glucose transporter and glucokinase genes [27]. Such data suggest that augmentation of incretin activity may in some sense rejuvenate β cells, which would serve to slow worsening of the dysregulation in glucose metabolism.

Conclusion

Favourable results have been achieved in reducing the risk of progression to T2DM in high-risk subjects using insulin-sensitizing agents and treatment that reduces postprandial hyperglycaemia. In spite of these encouraging results, broad use of pharmacological agents for the prevention of T2DM would require careful

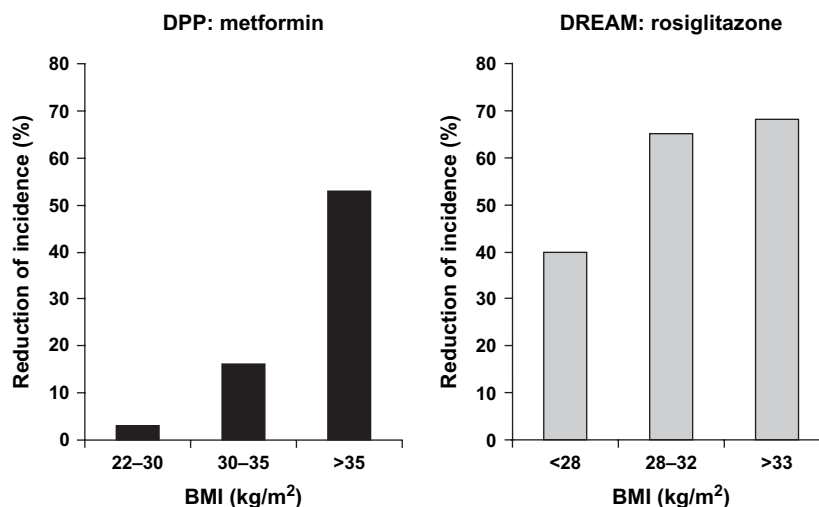


Fig. 1 Reduction in risk for progression to T2DM according to body mass index (BMI) with metformin treatment in the Diabetes Prevention Program (DPP) trial [9] and with rosiglitazone in the DREAM trial [12]. Data are from Diabetes Prevention Program Research Group [9] and Gerstein *et al.* [12].

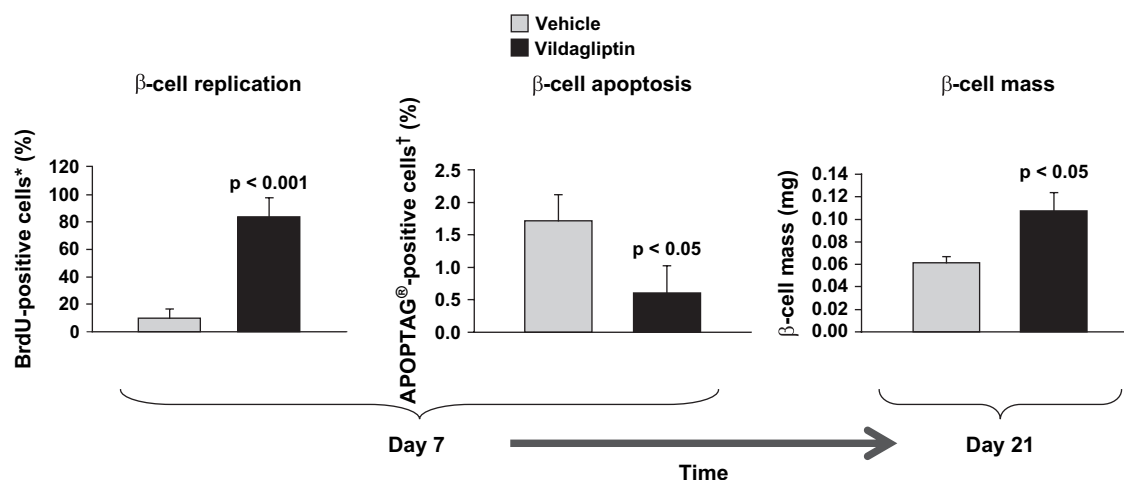


Fig. 2 Effect of vildagliptin (vilda) on pancreatic β -cell replication, apoptosis, and mass in the neonatal rat, a model for rapid β -cell turnover and growth. Adapted from Duttaroy *et al.* [25,26]. *Streptavidin-peroxidase staining. [†]APOPTAG[®]-peroxidase staining.

assessment of the risk/benefit profile of such treatments particularly because not all individuals with IGT evolve towards T2DM. Further, individuals with IGT may differ with regard to the underlying mechanisms of glycaemic dysregulation, and treatment that targets the wrong deficit may pose an unnecessary risk with reduced likelihood of benefit. From this point of view, the next challenge will be to develop methods that identify people with a high risk of developing T2DM, including phenotyping and, hopefully, genotyping, to allow tailored selection of the best preventive strategies.

References

- 1 International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. Available from URL: <http://www.eatlas.idf.org>. Accessed April 25 2007.
- 2 World Health Organization. Diabetes Programme Facts and Figures, 2007. World Health Organisation; Geneva, Switzerland. Available from URL: <http://www.who.int/diabetes/facts/en/>.
- 3 UK Prospective Diabetes Study Group. Quality of life in type 2 diabetic patients is affected by complications but not by intensive policies to improve blood glucose or blood pressure control (UKPDS 37). *Diabetes Care* 1999; **22**: 1125–1136.
- 4 Del Prato S. Tackling hyperglycemia: a more comprehensive approach. *Endocrinol Pract* 2006; **12**(Suppl. 1): 63–66.
- 5 Astrup A. Healthy lifestyles in Europe: prevention of obesity and type II diabetes by diet and physical activity. *Public Health Nutr* 2001; **4**: 499–515.
- 6 Fagot-Campagna A, Narayan KMV, Imperatore G. Type 2 diabetes in children. *BMJ* 2001; **322**: 377–378.
- 7 Pan XR, Li GW, Hu YH *et al.* Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 1997; **20**: 537–544.
- 8 Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG *et al.* Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1343–1350.
- 9 Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; **346**: 393–403.
- 10 Simpson RW, Shaw JE, Zimmet PZ. The prevention of type 2 diabetes-lifestyle change or pharmacotherapy? A challenge for the 21st century. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; **59**: 165–180.
- 11 Gerstein HC. Point: if it is important to prevent type 2 diabetes, it is important to consider all proven therapies within a comprehensive approach. *Diabetes Care* 2007; **30**: 432–434.
- 12 Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J *et al.* Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomized controlled trial. *Lancet* 2006; **368**: 1096–1105.
- 13 Knowler WE, Barrett-Connor E, Fowler SE *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; **346**: 393–403.
- 14 Ramachandran A, Snehalatha C, Mary S *et al.* Indian Diabetes Prevention Programme (IDPP). The Indian Diabetes Prevention Programme shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in

- Asian Indian subjects with impaired glucose tolerance (IDPP-1). *Diabetologia* 2006; **49**: 289–297.
- 15 Chiasson JL, Josse RG, Gomis R *et al.* Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet* 2002; **359**: 2072–2077.
 - 16 Diabetes Prevention Program Research Group. Prevention of type 2 diabetes with troglitazone in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 2005; **54**: 1150–1156.
 - 17 Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK *et al.* Preservation of pancreatic β -cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk Hispanic women. *Diabetes* 2002; **51**: 2796–2803.
 - 18 Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjöström L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 2004; **27**: 155–161.
 - 19 Lindström J, Louheranta A, Mannelin M *et al.* The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS). Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. *Diabetes Care* 2003; **26**: 3230–3236.
 - 20 Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007; **356**: 2457–2471.
 - 21 Del Prato S. In search of normoglycaemia in diabetes: controlling postprandial glucose. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**(Suppl. 3): S9–S17.
 - 22 Chiasson JL, Josse RG, Gomis R *et al.* Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance. The STOP-NIDDM trial. *JAMA* 2003; **290**: 486–494.
 - 23 Haffner S, Hotman R, Califf R *et al.* Targeting postprandial hyperglycemia to prevent type 2 diabetes: rationale and design of the NAVIGATOR trial. *Diabetologia* 2002; **45**(Suppl. 2): Abstract 106.
 - 24 Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the renin-angiotensin system. *Drugs* 2004; **64**: 2537–2565.
 - 25 Duttaroy A, Voelker F, Merriam K *et al.* The DPP-4 inhibitor vildagliptin increases pancreatic beta cell neogenesis and decreases apoptosis. *Diabetes* 2005; **54**(Suppl. 1): A141 (Abstract 572-P).
 - 26 Duttaroy A, Voelker F, Merriam K *et al.* The DPP-4 inhibitor vildagliptin increases pancreatic beta cell neogenesis and decreases apoptosis. Poster presented at ADA 2005. Poster 572-P.
 - 27 Lupi R, Mancarella R, Del Guerra S *et al.* The direct effects of exendin-4 on human non-diabetic and type 2 diabetic islets. *Diabetologia* 2006; **49**(Suppl. 1): 303.

For reprint orders, please contact:
reprints@future-drugs.com



Treating the metabolic syndrome

Cristina Bianchi, Giuseppe Penno, Fabiola Romero, Stefano Del Prato[†]
and Roberto Miccoli

CONTENTS

| |
|---|
| Lifestyle intervention |
| Treatment of insulin-resistance & abnormal glucose regulation |
| Treatment of obesity |
| Treatment of hypertension |
| Treatment of atherogenic dyslipidemia |
| Treatment of inflammation & coagulation abnormalities |
| Conclusion |
| Expert commentary |
| Five-year view |
| Key issues |
| References |
| Affiliations |

[†] Author for correspondence
University of Pisa, Department of
Endocrinology and Metabolism,
Cisanello University Hospital,
Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 103
Fax: +39 050 541 521
delprato@immr.med.unipi.it

KEYWORDS:
cardiovascular disease, insulin
resistance, metabolic syndrome,
therapy, Type 2 diabetes

The metabolic syndrome (MS), a cluster of metabolic abnormalities with insulin resistance as its central component, is increasing in prevalence and is associated with an increased risk of cardiovascular disease and Type 2 diabetes mellitus (T2DM). Current evidence supports an aggressive intervention approach that comprises lifestyle modification in conjunction with drug treatment of the MS components. Healthier eating and regular exercise greatly reduce waistline and body mass index, lower blood pressure and improve lipid profile. Lifestyle modification has been proven to prevent T2DM development. Nevertheless, appropriate treatment of MS components often requires pharmacologic intervention with insulin-sensitizing agents, such as metformin and thiazolidinediones, while statins and fibrates, or angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers are the first-line lipid-modifying or antihypertensive drugs. Only severely obese patients require specific drug treatments. Very often, drug combinations will be necessary to manage multiple risk factors. As we progress in the understanding of the pathophysiology of the MS, new targets for therapies will probably be identified and new treatments will prove to be even more efficacious than those currently available for the management of this life-threatening condition.

Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 5(3), 491–506 (2007)

The metabolic syndrome (MS) is a cluster of metabolic abnormalities including abdominal obesity, glucose intolerance, hypertension and dyslipidemia [1]. It carries an increased risk for cardiovascular disease and Type 2 diabetes mellitus (T2DM) [2]. Although most traits are common to all current diagnostic criteria of MS (TABLE 1), the definition of MS still remains a matter of uncertainty [3–6]. The diagnostic definition has some implication because it may, to some extent, be linked to different options of intervention. The Adult Treatment Panel (ATP) III [4], International Diabetes Federation (IDF) [5], and the most recent American Heart Association (AHA)/National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI) [6], definitions identify obesity (in particular, abdominal obesity) as the possible culprit of the syndrome, implying that much emphasis should be put on environmental factors and anti-obesity intervention.

The prevalence of this disorder is increasing all over the world, although its prevalence may vary a lot, ranging from 8% in India to 24%

in the USA. However, if the prevalence rate is adjusted for body mass index (BMI), MS prevalence becomes 2.5-fold greater in South Asian populations than in Caucasian ones [5]. The incidence of MS is expected to rise in the years to come [7], driven by lifestyle changes [8] and rising incidence of obesity [9]. Hence, lifestyle modification remains the best strategy to limit MS in the general population and to reduce the risk of T2DM and cardiovascular disease. Owing to this, the National Cholesterol Education Program (NCEP)–ATP III has identified MS as a target for vigorous lifestyle intervention [4]. However, lifestyle modifications, although powerful, are difficult to implement and maintain, therefore, pharmacotherapy may be necessary. In such a case, first-line therapy should be directed toward major cardiovascular risk factors: low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), hypertension, T2DM and obesity. There is no optimal treatment for this complex and multifactorial clinical entity and no guidelines are

Table 1. Metabolic syndrome: criteria and definitions.

| Study | | Glucose abnormalities | Central obesity | Dyslipidemia | Hypertension | Other |
|--------------|---|---|---|---|--|-----------------------------|
| WHO | Glucose/insulin criterion plus two more | Type 2 diabetes, impaired glucose tolerance or insulin resistance (HOMA-IR) | BMI >30 kg/m ² or waist-hip ratio >0.90 cm (men) >0.85 cm (women) | TG ≥150 mg/dl HDL <35 mg/dl (men) HDL <39 mg/dl (women) | On medication or untreated blood pressure ≥140/90 mmHg | Microalbuminuria ≥20 µg/min |
| NCEP-ATP III | Three of five criteria | Fasting plasma glucose ≥110 mg/dl (≥100 mg/dl)* | Waist circumference >102 cm (men) >88 cm (women) | TG ≥150 mg/dl HDL <40 mg/dl (men) HDL <50 mg/dl (women) | BP ≥130/85 mmHg | |
| IDF | Central obesity plus two more criteria | Fasting plasma glucose ≥100 mg/dl or previously diagnosed Type 2 diabetes | Waist circumference ≥94 cm (Europid men) ≥80 cm (Europid women) Ethnicity specific values for other groups | TG ≥150 mg/dl or specific treatment for this lipid abnormality HDL <40 mg/dl (men) HDL <50 mg/dl (women) or specific treatment for this lipid abnormality | Systolic BP ≥130 mmHg or diastolic BP ≥85 mmHg or treatment of previously diagnosed hypertension | |

*New cut-off proposed by American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute.

ATP: Adult treatment panel; BMI: Body mass index; BP: Blood pressure; HDL: High-density lipoprotein; HOMA-IR: H0meostasis Model Assessment of Insulin Resistance;

IDF: International Diabetes Federation; NCEP: National Cholesterol Education Program; TG: Triglyceride.

available for its treatment currently [6]. The current goals and recommendations for management of the MS are derived in a large part from a recent AHA/NHLBI scientific statement [9].

Lifestyle intervention

Important determinants of the MS, especially in young adults, are weight, fitness levels and lifestyle [10]. Physically active individuals, nonsmokers, those with relatively low carbohydrate intake, those who consume moderate levels of alcohol and those who maintain their BMI in the nonobese range, have low risk of MS [8].

Treatment of obesity, encouragement of physical activity and healthier diet through lifestyle modification represent the basic approach for the treatment of MS (TABLE 2). Even modest weight loss can significantly improve lipid profile and glucose tolerance, lower blood pressure and enhance insulin sensitivity [11]. Of interest, the attempt to lose weight independent of actual body-weight loss is associated with a reduction in all-cause mortality, supporting the positive impact of health awareness [12].

Lifestyle modification has been shown to reduce progression from impaired glucose tolerance (IGT) to T2DM in three intervention studies: the Finnish Diabetes Prevention Study (DPS) [13], the Diabetes Prevention Program (DPP) [14] and the Da Qing Trial [15]. In the DPS, therapeutic lifestyle changes were associated with a 60% reduction ($p < 0.001$) in the risk of developing T2DM [13]. Moreover, the beneficial effect of lifestyle modification was maintained over the 3-year postintervention follow-up [16]. In the DPP lifestyle changes or metformin therapy were implemented in the attempt to prevent

T2DM in high-risk subjects, demonstrating that nonpharmacologic intervention was more effective than pharmacotherapy (58 vs 31%, respectively) [14]. In this trial, 53% of participants met the ATP-III criteria for MS at baseline [17]. After 3.2 years, lifestyle intervention significantly reduced the incidence of MS compared with placebo ($p < 0.001$) [17]. Furthermore, among participants who did not have MS at baseline (47%), the incidence of the MS during follow-up was reduced by 41% with lifestyle intervention ($p < 0.001$) compared with placebo (TABLE 2) [17]. In the Da Qing Trial the cumulative incidence of T2DM at 6 years was 67.7% (59.8–75.2%) in the control group versus 43.8% (35.5–52.3%) in the diet group, 41.1% (33.4–49.4%) in the exercise group and 46.0% (37.3–54.7%) in the diet-plus-exercise group [15]. These studies provide strong support for lifestyle recommendations in subjects at high risk of T2DM.

A realistic goal for weight reduction is 7–10% bodyweight reduction over a period of 6–12 months. Long-term maintenance of weight loss is then best achieved when regular exercise is included in the weight-reduction program.

Recently, evidence-based nutritional recommendations for the treatment and prevention of MS have been proposed [18]. According to these recommendations, protein should contribute to 10–20% of total daily energy; saturated fatty acids and transunsaturated fatty acids should be no more than 10% of total energy and further lowered to less than 8% if the serum LDL-C level is increased; cholesterol intake should be 300 mg or less per day; carbohydrate intake should range between 45 and 60% of total energy.

Table 2. Suggested lifestyle changes in metabolic syndrome.

| Abnormality | Increase | Decrease |
|-----------------------------------|--|--|
| Central obesity | Physical activity | Total daily calories |
| Hypertriglyceridemia | Physical activity and ω -3 fatty acids | Bodyweight, saturated fats, sugar and refined carbohydrates, and alcohol consumption |
| Reduced high-density lipoproteins | Physical activity and monounsaturated fats | Saturated fats, bodyweight and smoking |
| Hypertension | Physical activity and fruits and vegetables | Bodyweight and sodium |
| Glucose abnormalities | Physical activity, dietary fiber (more than 30 g/day), fruits, vegetables and whole grains | Bodyweight, sugar and refined carbohydrates, and saturated fats |

Dietary reduction of saturated fats may be useful to improve insulin sensitivity. In fact, an increased free fatty acid (FFA) level and, more importantly, the relative amounts of saturated and unsaturated fatty acids (related to the composition of dietary fat), plays an important role in the development of insulin resistance [19]. Both the dietary intake and plasma levels determine the fatty acid composition of cell membranes and higher levels of membrane saturated fatty acids appear to greatly impair the action of insulin, whereas the presence of polyunsaturated fatty acids, especially of the ω -3 and ω -6 families and, in particular, their relative ratio, by contrast, improves insulin sensitivity [20,21]. A multicenter study (Kuopio, Aarhus, Naples, Wollongong and Uppsala [KANWU]) has shown that shifting from a diet rich in saturated fatty acids to one rich in monounsaturated fat improves insulin sensitivity in healthy people, whereas a moderate ω -3 fatty acid supplementation does not affect insulin sensitivity [22]. Moreover, it has been suggested that diets higher in saturated fat may pose a higher diabetes risk than those higher in unsaturated fat [23].

Vegetables, legumes, fruits and whole-grain cereals represent the most appropriate sources of carbohydrate. Moreover, foods rich in dietary fiber are strongly recommended, with a total dietary fiber intake of at least 40 g/day (or 20 g/1000 kcal/day) with approximately half of them in their soluble form. Several studies have shown that a high intake of dietary fiber is associated with enhanced insulin sensitivity, while a diet high in rapidly absorbed carbohydrates and low in cereal fiber is associated with an increased risk of T2DM [24,25].

Sodium restriction can reduce systolic blood pressure in hypertensive patients and enhance the blood pressure-lowering effects of other dietary manipulations (low-fat dairy products, fruits and vegetables) or pharmacologic treatment. Hence, salt intake should not exceed 6 g/day, with the possibility of further restriction for patients with elevated blood pressure.

Moderate alcohol intake has been associated with a lower prevalence of MS, with a favorable influence on lipids, waist circumference and fasting insulin [26]. However, alcoholic beverages should be limited to no more than two drinks per day for men and one drink per day for women (ideally should be consumed with meals) [27], since a greater alcohol consumption has been associated with a high risk of overweight and obesity [28].

Many aspects of this dietary pattern are present in the Mediterranean diet and adherence to this model is related to a low mortality and prevalence of metabolic disorders (such as obesity, and high blood pressure), as well as a low incidence of coronary heart disease [29].

Regular physical exercise improves several risk factors associated with MS [30,31]. Skeletal muscle is an exquisite insulin-sensitive tissue and, therefore, a primary target for insulin sensitization. Physical training reduces insulin resistance, lowers muscle lipid content and results in an improved plasma lipid profile, as well as other risk factors, regardless of BMI changes [32]. The impact of exercise on insulin sensitivity persists between 24 and 48 h disappears within 3–5 days. Thus, regular physical activity has to be planned in order to gain steady improvement of insulin sensitivity. For this reason, guidelines recommend regular and moderate exercise [33], such as 30-min daily of moderate-intensity physical activity. Increasing the level of physical activity (e.g., 1 h daily) appears to further enhance beneficial effects. A total of 1 h a day walking or light jogging favors significant losses of abdominal (visceral) fat when performed in a nonrestricted diet regimen [34]. Along with dietary and physical activity recommendation, smoking cessation must always be encouraged.

Treatment of insulin-resistance & abnormal glucose regulation
Insulin-resistance is often associated with MS and believed to play a pathogenetic role in its development [22]. Impaired insulin action is also a determinant of glucose intolerance and T2DM [35]. Disturbances of glucose metabolism are often present in people with MS, and impaired fasting glucose (IFG) is a diagnostic trait for the syndrome. At least 20% of subjects over 40 years of age with MS also have T2DM [36] and most people with T2DM have MS [37]. When people with prediabetes (IGT or IFG) are considered, MS is diagnosed in at least 50% of them [38]. Moreover, in T2DM the prevalence of MS is related to prevalent glycemic control as indicated by HbA1c, suggesting that strict glycemic control may significantly reduce the number of the traits contributing to the diagnosis of the MS and related cardiovascular risk. Though many antidiabetic treatments can be used to attain such a goal, the strict association between insulin resistance, T2DM and MS favors the hypothesis that insulin sensitizers, such as metformin and thiazolidinediones, may represent a rational pharmacologic approach.

The DPP demonstrated that both metformin and troglitazone (an agent no longer available owing to hepatic toxicity) reduce the rate of conversion from IGT to T2DM. The likelihood of T2DM was reduced to a greater extent in subjects on metformin (7.8 cases per 100 patient-years) compared with controls, although such an effect was lower (31%) than with lifestyle modification [14]. The effect of metformin was maintained as long as treatment continued, whereas metformin withdrawal was associated with a rapid increase in T2DM conversion rate [39]. The same was true for troglitazone: while patients were undergoing treatment there was a reduced conversion rate and loss of protection occurred as soon as treatment was discontinued [40]. This is different from what was observed in women with previous gestational diabetes recruited in the Troglitazone In Prevention Of Diabetes (TRIPOD) study where troglitazone reduced T2DM incidence from 45 to 20% (relative risk [RR] 0.45; 95% confidence interval [CI]: 0.25–0.83). Moreover, the protection from T2DM in the troglitazone group persisted for 8 months after study medications were stopped [41]. Upon troglitazone withdrawal from the market, pioglitazone was used (Pioglitazone In Prevention Of Diabetes [PIPOD] study) confirming the preventive effect [42]. The risk of T2DM, which occurred at an average rate of 4.6% per year, was lower in women with the largest improvement of insulin sensitivity and better preservation of β -cell function [42]. The similarity of the results obtained with troglitazone and pioglitazone support a class effect of thiazolidinediones on insulin sensitivity, reduction of insulin secretory demand and possible preservation of β -cell function [42]. Similar results have been obtained in the DREAM study [43]. In this study, rosiglitazone reduced progression from IGT/IFG to T2DM by 60%, an effect that was particularly pronounced in obese subjects [43].

Insulin-sensitization has been claimed to confer a certain degree of cardiovascular protection, a main concern in individuals with MS. This potential effect may go beyond the antihyperglycemic effects of these drugs and actually take advantage by the trivial risk of hypoglycemia even in non-diabetic individuals. Along with an average HbA1c reduction of 1.5–2.0% in diabetic patients, metformin may exert favorable effects on the lipid profile, on the levels of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, fibrinogen, factor VII and vascular cell adhesion molecules, including soluble vascular cell adhesion molecule-1 [44–46]. *In vitro* studies have demonstrated that metformin can reduce lipid incorporation into cellular and extracellular components of the atherosclerotic plaque and decrease vascular smooth muscle proliferation [47]. Additionally, metformin may reduce glycation, reactive oxidative stress generation and platelet aggregation, and also slow differentiation of monocytes into macrophages in the vessel wall [47]. Finally, it exerts a moderate anorexic effect that may contribute to bodyweight reduction. These multiple effects were attributed to the cardiovascular protection brought about by the UK Prospective Diabetes Study results [48]. Within the DPP study, metformin reduced the incidence of MS by 17% ($p = 0.03$) compared with placebo, however, similar to what

was observed in terms of T2DM prevention, this effect was lower than that obtained with lifestyle modification (TABLE 2). The 3-year cumulative incidences of MS were 51, 45 and 34% in the placebo, metformin and lifestyle groups, respectively [17].

Glitazones are claimed to exert pleiotropic effects that may contribute to reduce cardiovascular risk, including anti-inflammatory action. Treatment with glitazones reduces C-reactive protein (CRP), white blood cell, matrix metalloproteinase (MMP)-9 and PAI-1 levels [49]. Owing to a prominent effect on adipose tissue, glitazones increase the levels of circulating adiponectin, a powerful mediator of insulin action and endothelial function [50]. In some studies, glitazones showed beneficial effects on the dyslipidemic profile in T2DM patients, although such an effect appears to be more pronounced with pioglitazone. A moderate reduction in blood pressure has also been reported [43]. In contrast to metformin, glitazones may cause bodyweight gain. However, this occurs mainly because of increased subcutaneous fat with concomitant reduction of visceral and ectopic (i.e., muscle and liver) fat deposition. Since it is the visceral fat that leads to the inflammatory response and proatherogenic lipid profile a degree of cardiovascular protection is considered to be retained in spite of bodyweight gain. This view has been supported by the results of the DREAM study where in the face of the increase of hip circumference (a marker of subcutaneous adiposity) waist girth remained constant [43].

Despite a large body of data supporting the potential cardiovascular protection of glitazones, clinical data remain limited. Small studies have indicated that these medications may reduce vessel restenosis in T2DM patients undergoing coronary stenting [51,52]. PROactive is the only large-scale clinical trial available to date [53]. The study was performed in 5238 high-risk T2DM patients. While no difference was apparent in the primary end points (death from any cause, nonfatal myocardial infarction, stroke, acute coronary syndrome, leg amputation, coronary revascularization or revascularization of the leg), preselected major secondary end points (death from any cause, nonfatal myocardial infarction or stroke) have indicated a statistically significant effect (-16%; $p = 0.027$) of pioglitazone and on pre-existing anti-diabetic therapy. Other studies are currently ongoing and their results will help to better define the true clinical cardiovascular protection that these agents may confer.

Whether these potential benefits might also apply to MS patients remain to be ascertained. From this viewpoint none of the prevention studies employing metformin or glitazone have reported any reduction in cardiovascular events or mortality, although the size of the population studies may not be large enough to ensure statistical power.

Insulin-resistance is associated with fat accumulation in the liver, a condition known as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [54]. NAFLD is increasingly recognized as a common feature in patients with MS. Ectopic accumulation of fat in the liver is not a benign condition as it is strongly associated with insulin resistance and metabolic disturbances. Moreover, patients with NAFLD may develop necroinflammatory changes

in the liver or nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and a fraction of them may evolve toward cirrhosis. In a proof-of-concept study, administration of pioglitazone also led to metabolic improvement and histological signs of NASH reversal [55].

Improvement of insulin resistance, which can be pursued with lifestyle modification and insulin-sensitizing agents has been advocated on the basis that impaired insulin action may represent a common pathogenetic factor for many of the alterations of MS. Insulin resistance and concomitant hyperinsulinemia might favor impaired glucose tolerance and T2DM, increased very low-density lipoprotein (VLDL)-triglyceride and reduced high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) in blood, increase blood pressure and favor bodyweight gain [56,57]. However, the existence of a common pathogenetic mechanism responsible for the constellation of metabolic and nonmetabolic alterations of the syndrome has been recently challenged by a joint document of the American Diabetes Association (ADA) and European Association for the Study of Diabetes (EASD) [58]. While only a percentage of individuals with MS are insulin resistant [59], it has been proposed that other factors may contribute to the clustering of multiple cardiovascular risks, including endothelial dysfunction, inflammation and central obesity. Owing to these uncertainties it has then been proposed that 'clinicians should evaluate and treat all cardiovascular risk factors without regard to whether a patient meets the criteria for diagnosis of the MS'.

Treatment of obesity

Obesity, and visceral obesity in particular, are considered a primary causative factor with regards to the growing prevalence of MS globally. Particular emphasis has been placed on visceral obesity, as the visceral adipose tissue appears to be particularly reactive in response to tissue growth. Recent studies have indicated a strong association between intra-abdominal fat and MS [60] and shown how visceral adipocyte differentiation becomes a source not only of FFAs but also of cytokines (tumor necrosis factor [TNF]- α , interleukin [IL]-6 and resistin) that contribute to impair insulin action on insulin-dependent tissues. Moreover, reduced adiponectin production limits the insulin sensitization, anti-inflammatory and antiatherogenic action of this molecule [61]. Owing to the pivotal role that central obesity appears to play in the pathogenesis of MS, the recent definition of IDF considers evidence of obesity to be a prerequisite for its diagnosis. To this purpose, ethnic-specific cut-off values for waist circumference have been set [5]. It is readily apparent that if this diagnostic (and interpretative, i.e., the primary role of visceral obesity in the pathogenesis of MS) approach is adopted, effective management of obesity in patients with MS becomes a major therapeutic goal.

As discussed previously, even moderate bodyweight loss can be associated with major effects on all components of MS and related risk factors [60,62–64], although diet and physical exercise may be difficult to implement and maintain over time. Pharmacological intervention may, then, become necessary to contribute to weight loss and maintenance. Antiobesity drugs should be

considered in adults with 'clinically significant' obesity, that is, with a BMI of at least 30 kg/m² or 27–29 kg/m² if one or more obesity-related disorders, in particular T2DM or hypertension, are associated and whenever conservative measures, such as behavior therapy, diet and exercise, have failed [65].

To date, agents for the management of obesity have been limited and unsatisfactory. Amphetamines have profound euphoric actions and carry the potential for abuse and addiction [66]. Phentermine has stimulant and sympathomimetic effects through catecholaminergic pathways [67]. Appetite suppressants based on phenylpropanolamine have been associated with an increased risk of hemorrhagic stroke in women [68] and have been withdrawn by the US FDA. Fenfluramine and dexfenfluramine are centrally acting appetite suppressants, which interfere with serotonin release. These compounds have also been withdrawn from the market owing to associated pulmonary hypertension and heart valve damage [67,68]. The drugs currently available are sibutramine and orlistat.

Sibutramine acts on the CNS to increase satiety, reduce hunger and lower the drop in metabolic rate that follows weight loss [69]. More than ten prospective, randomized, controlled trials with sibutramine have supported its efficacy [70]. An analysis of three trials of at least a years' duration demonstrates that patients on sibutramine lost 4.3 kg or 4.6% more weight than those on placebo; 34% more patients achieved at least 5% weight loss and 15% more patients achieved at least 10% weight loss compared with placebo [71]. In the Sibutramine Trial in Obesity Reduction and Maintenance (STORM), 605 obese patients underwent a diet program and sibutramine for 6 months and were then randomized to an additional 18-month weight maintenance period while on sibutramine or placebo [72]. A total of 43% of patients on sibutramine maintained 80% of their initial bodyweight loss compared with placebo. In patients with T2DM, weight loss has been accompanied by improved insulin sensitivity, glycemic control and blood lipid profile [73]. A positive influence on adipocytokines has been reported, as indicated by a reduction in leptin levels and increased adiponectin concentration. Although, potentially useful in improving the metabolic picture in obese patients with MS, patients have to be monitored for heart rate and blood pressure as sibutramine may result in their increase [74].

Orlistat, an inhibitor of pancreatic and gastrointestinal lipases, prevents the absorption of approximately 30% of dietary fat. Pooled results of 11 prospective, randomized controlled trials demonstrate, in subjects treated with orlistat, a 2.7 kg or 2.9% greater reduction in weight than in placebo-treated patients after a 1-year follow-up [71]. Orlistat reduces LDL and cholesterol levels, independent of bodyweight reductions, decreases the progression to T2DM and leads to improved glycemic control in T2DM patients [70]. In the XENical in the prevention of Diabetes in Obese Subjects trial (XENDOS; n = 3305 obese nondiabetic individuals), orlistat, combined with lifestyle changes, reduced the incidence of T2DM compared with placebo (plus lifestyle changes) by 37.3% (p = 0.0032) [75]. Furthermore, in the ORLI-stat and CARDiovascular risk profile in patients with MS and

Type 2 Diabetes study (ORLICARDIA) [76], the combination of orlistat and hypocaloric diet for 6 months reduced the proportion of patients meeting the diagnostic criteria of the MS by 35% compared with low-calorie diet alone (by 9%; $p < 0.0001$) in patients ($n = 126$) with both T2DM and MS (TABLE 2). These findings have been confirmed by the FenOrli study [77]. However, this was a small (89 overweight subjects) open-label study.

Much expectation has been generated by rimonabant, the first drug to target the endocannabinoid (CB) pathway by inhibiting CB1 receptors. Blockade of central CB1 receptors reduces appetite, while blockade of the peripheral receptors is believed to affect adipose tissue and the liver, resulting in improvement in glucose, fat and lipid metabolism that is independent of body-weight change [78]. These effects have been tested in experimental animals and assessed in clinical trials: the Rimonabant In Obesity (RIO) trials. These clinical studies have demonstrated that rimonabant at the dose of 20 mg/day induces more than 5% weight loss in 30–40% of patients and greater than 10% weight loss in 10–20% of patients compared with diet alone over a 2-year period, with a low level of drug-related side effects [79–82]. Rimonabant therapy is associated with an extra 8–10% increase in HDL-C and a 10–30% reduction in triglycerides and improvements in insulin-resistance, glycemic control in patients with T2DM, as well as adipokines and cytokines including CRP [79–82]. In the RIO-diabetes, overweight T2DM patients already on oral antidiabetic therapy were recruited in a 2-year study comparing the effect of adding 5 or 20 mg/day rimonabant to existing antidiabetic therapy on glycemic control and metabolic parameters. Relevant clinical results were obtained mainly with 20 mg/day rimonabant, however, a significant reduction in bodyweight and waist circumference was also obtained with the lowest dose. In particular, treatment with higher doses of rimonabant was associated with significant reduction, compared with placebo, of HbA1c, fasting plasma glucose, HOMEostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), triglycerides, blood pressure, high sensitive CRP and leptin, while a significant increase in HDL-C was also apparent. Owing to the multiple effects of treatment, the persisting prevalence of MS was lower in the 20 mg/day rimonabant group than in the placebo group at 1-year accounting for a net 12.3% (placebo 7.6%; $p = 0.007$) reduction among diabetic patients (TABLE 2) [79]. A similar beneficial effect on the prevalence of MS has been observed in obese nondiabetic individuals. In the RIO-Europe study [80], rimonabant reduced the prevalence of MS from 42 to 19.6% (FIGURE 1 & TABLE 3), while among dyslipidemic subjects enrolled in the RIO-Lipids study (FIGURE 1 & TABLE 2), the prevalence of MS was reduced from 50 to 25.8% [81]. The most common adverse events resulting in discontinuation in the trials have been depressed mood disorders, anxiety, nausea and dizziness [79–82]. The European Medicines Agency has approved rimonabant as an adjunct therapy to diet and exercise for the treatment of obesity in patients with a BMI of at least 30 kg/m² and in overweight patients with a BMI of more than 27 kg/m² with associated risk factors, such as T2DM or dyslipidemia. To date, the FDA has not approved rimonabant.

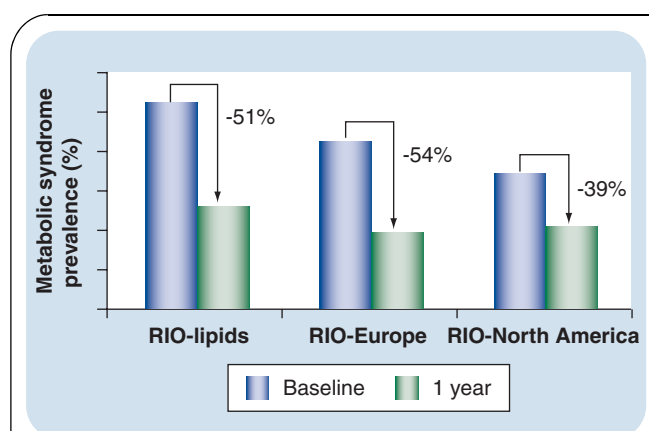


Figure 1. Reduction of metabolic syndrome prevalence by rimonabant (20 mg) therapy in the RIO studies.
RIO: Rimonabant In Obesity.

The importance of effective weight reduction is also supported by initial results obtained in massively obese individuals undergoing bariatric surgery. In the series of 645 individuals reported by Lee and colleagues [83], the prevalence of MS was 52.2%. Substantial weight reduction (32%) in those patients was associated with an improvement of all main traits of the syndrome 1 year after surgery, resulting in a 95.6% resolution of MS. Weight-loss surgery (bariatric surgery) is the only option today that effectively treats morbid obesity when other treatments have failed. Limited evidence suggests that surgery is more effective than conventional management for weight loss in morbid obesity. Compared with conventional management, surgery resulted in greater weight loss (21 kg weight loss at 8 years vs weight gain), with improvements in quality of life and comorbidities. However, the comparative safety and effectiveness of different surgical procedures is unclear. The prevalence of MS is 52.2% among morbidly obese individuals enrolling in an obesity-surgery program. Lee and colleagues demonstrated that a significant weight reduction a year after surgery markedly improved all aspects of MS and resulted in a cure rate of 95.6%. Obesity surgery performed by laparoscopy surgery should be useful for obese patients with MS [84].

Treatment of hypertension

When faced with a syndrome such as the MS, intensive treatment of each one of its components cannot be avoided; this may be particularly true when hypertension is considered. In a recent study, it was shown that the presence of MS in the absence of T2DM conferred an almost fivefold increase in the odds of early-onset coronary artery disease; combined with T2DM, the odds ratio was eight. However, in multivariate analysis, MS conveyed no additional predictive information beyond its components, with hypertension standing up as a powerful independent risk factor, followed by low HDL-C and hyperglycemia [85]. The majority of individuals with MS have some elevation of blood pressure and, when T2DM ensues, hypertension is almost always present. When overt hypertension is present without T2DM or chronic kidney disease,

Table 3. Reduction of metabolic syndrome in clinical trials.

| Study | Patients (n) | Follow-up | Patients characteristic | Treatment | Metabolic syndrome reduction (%) |
|-------------------------|--------------|-----------|---------------------------|------------|----------------------------------|
| <i>Incidence study</i> | | | | | |
| DPP | 3234 | 3 years | IGT | Lifestyle | -41 |
| DPP | 3234 | 3 years | IGT | Metformin | -17 |
| RIO-Diabetes | 1047 | 1 year | Obesity + Type 2 diabetes | Rimonabant | -11 |
| <i>Prevalence study</i> | | | | | |
| ORLICARDIA | 126 | 6 months | Obesity + Type 2 diabetes | Orlistat | -35 |
| RIO-North America | 3045 | 2 years | Obesity | Rimonabant | -39 |
| RIO-Europe | 1507 | 1 year | Obesity | Rimonabant | -51 |
| RIO-Lipids | 1036 | 1 year | Obesity + dyslipidemia | Rimonabant | -54 |

DPP: Diabetes Prevention Program; IGT: Impaired glucose tolerance; ORLICARDIA: ORlistat and CARDiovascular risk profile in patients with metabolic syndrome and Type 2 Diabetes Study; RIO: Rimonabant In Obesity.

the goal for antihypertensive therapy is a blood pressure of less than 140/90 mmHg [86]. In the presence of T2DM or chronic kidney disease, the blood pressure goal should be reduced to below 130/80 mmHg [86].

Mild elevations of blood pressure, as are diagnosed in many MS individuals, may benefit from lifestyle modifications [13]. However, even a slightly more severe increase of blood pressure requires a pharmaceutical approach. Several options are available for the control of hypertension and often a multidrug treatment is necessary. This treatment should be, whenever possible, neutral with respect to the accompanying disturbances of the MS. β -blockers, for instance, are effective in controlling blood pressure and in reducing the risk of reinfarction. However, they have potential for adverse metabolic effects, such as an increase in LDL-C and triglycerides, as well as a worsening of insulin resistance [87,88]. The same profile is shared by thiazide diuretics [89] and both agents appear to be associated with a greater risk of new-onset T2DM than other antihypertensive drugs. Despite the potential adverse effects, the Seventh Report of the Joint National Committee on the prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC7) was reluctant to recommend against the use of thiazides and β -blockers for the treatment of hypertension because of the well-established benefits [86]. A recent study demonstrated that one β -blocker, carvedilol, is not associated with the typical adverse metabolic effects of β -blockers [90].

Imidazoline receptor agonists (e.g., moxonidine) and $\alpha 1$ -blockers have been reported to increase insulin sensitivity [91]. Despite the effect on insulin sensitivity of α -blockers, the Antihypertensive Lipid-Lowering treatment to prevent Heart Attack Trial (ALLHAT) [92] demonstrated that treatment of hypertension with doxazosin in adults with glucose disorders incurred the same risk of coronary heart disease as treatment with chlorthalidone but treatment with doxazosin increased the risk of combined cardiovascular disease and heart failure

despite lower glucose levels. The calcium-channel blockers appear to be neutral with respect to both lipids and insulin resistance [91].

More evidence has been gathered indicating that agents interfering with the renin-angiotensin-aldosterone system (angiotensin-converting enzyme inhibitors [ACEIs]; and angiotensin-II-receptor blockers [ARBs]), may have beneficial metabolic effects, if not improving insulin sensitivity. These drugs have been shown repeatedly to be renal- and cardio-protective, reducing progression toward end-stage kidney disease, as well as cardiovascular morbidity and mortality [93–97]. ACEIs or ARBs can slow progression of atherosclerosis not only by reduction of blood pressure but also by improving endothelial function and the fibrinolytic balance, enhancing nitric oxide release and reducing vascular inflammation [98,99]. More recent is the discovery that the ARBs telmisartan and irbesartan [100], are capable of activating peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , thus providing a novel approach to addressing the multifactorial components of the MS in hypertensive patients. Both drugs have established favorable safety profiles and can activate PPAR γ at concentrations potentially achievable at therapeutic doses. Beneficial effects of these agents include increased energy expenditure, improved lipid profile, increased insulin sensitivity, blood pressure reduction and amelioration of the associated pro-inflammatory and proatherogenic risk profiles [100].

Of particular interest for subjects with MS are recent data on the benefits of both classes of drugs in treating high-risk patients and preventing T2DM. A *post hoc* analysis of non-diabetic subjects in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) study demonstrated a 30% reduction in the risk of developing T2DM in those treated with ramipril compared with placebo [101–103]. However, the recent DREAM study demonstrated that, in patients with IFG or IGT, the use of ramipril did not significantly reduce the incidence of T2DM or

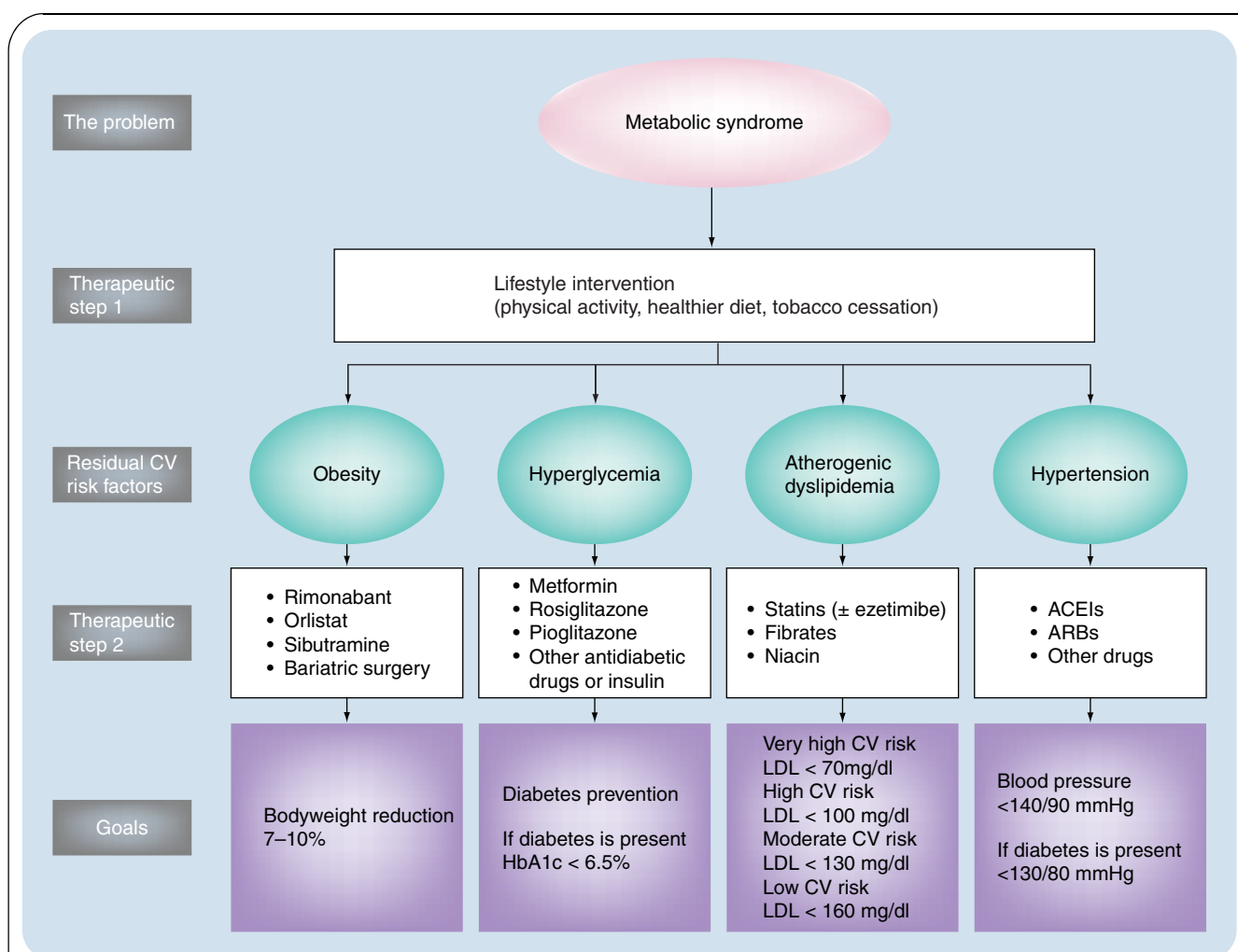


Figure 2. Flow-chart for treatment of the metabolic syndrome.

ACEI: Angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB: Angiotensin receptor blocker; CV: Cardiovascular; LDL: Low-density lipoprotein.

death but significantly increased regression to normoglycemia [104]. To what extent this may be due to the underlying severity of the cardiovascular risk remains to be established.

Treatment of atherogenic dyslipidemia

Atherogenic dyslipidemia is an important component of MS and is characterized by increased levels of triglycerides and apolipoprotein (apo)B, small and dense LDL-C particles, and low levels of HDL-C. Despite the fact that elevated serum concentration of LDL-C are not necessarily associated with MS, the ATP III recommend lowering LDL-C as a primary target of therapy even in MS [4], followed by targeting HDL-C when triglyceride levels are at least 200 mg/dl.

Based on these recommendations, statins stand up as first-line therapy for aggressive lipid-lowering intervention [4], and this approach is substantiated by clinical trials. In the subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) it was apparent that nondiabetic patients with coronary heart disease with or without MS realized from simvastatin treatment a similar, substantial relative reduction in the risk of

cardiovascular events. However, the absolute benefit was deemed to be greater in patients with MS owing to much higher absolute cardiovascular risk [105]. Recently, a retrospective chart review involving all patients actively taking simvastatin 80 mg at the Veterans Affairs Medical Center, showed that high-dose simvastatin was required to reduce excess events in very high-risk cohorts with MS [106]. Moreover, the *post hoc* analysis of the Treating to New Targets (TNT) study indicates that patients with coronary heart disease and MS derive incremental benefit from high-dose atorvastatin therapy, irrespective of the presence of T2DM [107].

Lipid-lowering treatment in MS patients should consider tackling, as well as LDL-C, the common alterations of HDL-C and triglycerides. From this viewpoint, data from recent studies have suggested potential differences amongst statins. In the Comparative HDL Efficacy and Safety Study (CHES), maximum doses of simvastatin and atorvastatin were compared for efficacy on HDL-C and apoA-I in hypercholesterolemic patients with or without MS [108]. While LDL-C and triglyceride reductions were greater with atorvastatin 80 mg, simvastatin

80 mg was more effective in raising HDL-cholesterol and apoA-I levels. These differences were observed regardless of baseline HDL-C or the presence of MS [108]. A subgroup analysis of patients with MS enrolled in the Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin therapy (MERCURY) I study [109] demonstrated that, compared with commonly used doses of other statins, 10 mg rosuvastatin produced more beneficial effects across the lipid profile allowing a greater proportion of patients with MS to achieve the LDL-C goal [110]. Results from the COmparative study with rosuvastatin in subjects with METabolic Syndrome (COMETS) also indicate that rosuvastatin is an effective lipid-modifying agent in patients with MS [111]. Rosuvastatin had a significantly greater effect than atorvastatin in lowering LDL-C and improving HDL- and non-HDL-C levels. Effects on triglyceride and CRP levels were similar between treatments [111].

Nonetheless, current statin monotherapy is still leaving many patients with atherogenic dyslipidemia at excessive risk for coronary events and unable to ensure achievement of all lipid targets. For this reason, other therapeutic approaches have to be taken into consideration even for possible combination therapy.

Ezetimibe is a novel cholesterol absorption inhibitor that blocks the translocation of dietary and biliary cholesterol from the gastrointestinal lumen into the intracellular space of jejunal enterocytes. Ezetimibe in addition to the ongoing statin therapy of patients with T2DM or MS is associated with a greater proportion of individuals attaining lipid therapeutic goals [112]. Whether coadministration of ezetimibe and a statin has a morbidity or mortality advantage over up-titration of statin monotherapy has yet to be proven.

Fibrates are agonists of PPAR α and exert beneficial effects on the atherogenic lipid abnormalities frequently associated with MS and T2DM. Of interest, fibrates may exert favorable effects on many components of the MS. Thus, use of gemfibrozil in T2DM patients resulted in lowering of serum triglycerides, improvement of insulin sensitivity, as well as endothelial dysfunction [113]. Similar results have been obtained in individuals with MS treated with fenofibrate, in whom an increase in serum adiponectin was also found [114]. Recent extensions of the Helsinki Heart Study (HHS) [115], the Veterans Affairs High-density lipoprotein cholesterol Intervention Trial (VAHIT) [116], and Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) [117] have provided further support to the hypothesis that patients with insulin resistance, such as those with T2DM and/or MS, might gain the most benefit from therapy with fibrates. The patients participating in the VAHIT study, in addition to low HDL-cholesterol, had many other features of MS, including high prevalence of hypertriglyceridemia, hypertension and T2DM or IFG. The primary finding from the study was a 22% reduction in coronary heart disease death or nonfatal myocardial infarction after 5-year gemfibrozil treatment [116]. Subsequent analyses demonstrated that gemfibrozil was more effective in subjects with T2DM or a high fasting plasma insulin level [118], and that the benefit of treatment was more dependent on the presence or absence of insulin resistance than on HDL-C level [119].

Nicotinic acid is a powerful lipid-lowering drug that reduces all apoB-containing lipoproteins and raises HDL-C levels. In patients with MS and T2DM, nicotinic acid appears to decrease the risk for cardiovascular diseases [120]. However, nicotinic acid worsens insulin resistance and can exacerbate hyperglycemia in patients with T2DM [121].

Treatment of inflammation & coagulation abnormalities

MS is frequently associated with a proinflammatory state, as shown by elevated concentrations of circulating cytokines (e.g., TNF- α and IL-6) and acute-phase reactants (e.g., CRP and fibrinogen) [122,123]. The role of inflammation on cardiovascular risk has been largely demonstrated [124]. Moreover, elevation of CRP in subjects with MS is associated with much greater cardiovascular risk [122]. As already discussed for all other components of MS, lifestyle modification, in particular weight reduction, can effectively reduce CRP levels and presumably mitigate the underlying inflammatory stimuli [125]. From the pharmacologic point of view, no specific drug is yet available to reduce the inflammatory state accompanying MS and cardiovascular disease. However, a number of agents commonly used in these patients, including statins, nicotinic acid, fibrates, ACEIs and thiazolidinediones, may exert an anti-inflammatory action, [126–128]. Therefore, it appears that rationale use of an adequate dose of these drugs, whenever indicated, may also result in reduction of inflammatory proteins.

A procoagulative state characterizes individuals with MS due to elevation of the circulating levels of fibrinogen, factor VII and PAI-1, as well as increased platelet aggregation [129]. At present, no specific drugs are available for the treatment of the prothrombotic state, although a therapeutic option is low-dose aspirin or other antiplatelet agents. However, all manoeuvres that may improve the metabolic condition, including glycemic control, triglyceride lowering and increased insulin sensitivity appear to favorably affect the coagulation profile. Aspirin is, of course, to be considered as an efficacious anti-aggregant agent according to current indication for patients at high cardiovascular risk [130].

Conclusion

MS is a cluster of cardiovascular risk factors driven by lifestyle changes and ensuing obesity. Therefore, therapeutic approaches should begin with restoration of healthier lifestyle, bodyweight reduction and regular physical activity. For each of the components of the syndrome, multiple pharmacologic possibilities exist. Insulin resistance can be improved by insulin sensitizers, such as metformin and glitazones. New drugs for controlling bodyweight are going to be available and agents, such as rimonabant, may have added direct metabolic effects. Several drugs are available for lowering arterial blood pressure. The choice of agents that interfere with the renin-angiotensin system may be recommended due to metabolic neutrality and possible interference of AT1 receptor antagonist with the PPAR γ -signalling pathway. Elevation of LDL-C is not a feature of MS, but, because of the

high cardiovascular risk of these individuals, intensive control of its level by adequate use of statins is mandatory. Accompanying dyslipidemia may require specific pharmacologic attention. Inflammation is becoming a main trait of the MS. No selective treatment is yet available but careful management of many of the treatable symptoms of the syndrome is likely to reduce inflammation and related cardiovascular risk.

Expert commentary

MS is becoming increasingly common. In Western societies prevalence already exceeds 25% of the adult population, that is, a quarter of people over 25 years of age. Owing to this, a rise in the incidence of T2DM and cardiovascular disease has been forecasted. Since cardiovascular mortality has been dropping for the past 50 years, one may wonder whether we are going to experience a change in this trend in the near future.

In view of this dramatic possibility a preventative, rather than a therapeutic, approach should be implemented. Since the main cause for the spreading of MS appears to be related to changes in lifestyle, it seems obvious that this should be the main goal for prevention. The evidence for the efficacy of lifestyle modification has been produced and confirmed [17]. The difficulties to implement it and, even more critical, to maintain the benefits initially generated, are fully apparent and will represent a main challenge in the future. This will require more than medical plans. Population programs aimed at increasing the awareness of the risk of a sedentary lifestyle and incongruous dietary habits will soon become necessary. Together with such programs, plans are needed to increase early identification of people at high risk for T2DM and/or cardiovascular disease. From this viewpoint, a condition such as MS may provide a simple but useful tool since recognition of one altered trait may facilitate the search of all those associated.

The efficacy of a prevention program may also lend support to the hypothesis that a common pathogenetic ground exists to account for the clustering, in a single individual, of that many cardiovascular risk factors. In support of this possibility is the powerful effect that bodyweight reduction exerts on the reduction of MS. This possibility is also supported by the observation that treating one trait of the syndrome, often results in an improvement of the other components as well. For instance, restoration of a healthier diet, such as the Mediterranean diet, reduces bodyweight but also increases insulin sensitivity, lowers CRP levels and improves endothelial function so that MS prevalence decreases [131]. If the primary target for treatment is insulin resistance, use of glitazone will lead to improved glucose tolerance and a better lipid profile, as well as a reduced inflammatory response and rescue of endothelial dysfunction [132]. Similar effects can be achieved when hypertension is tackled, particularly if ARBs are used. In the MS-Irbesartan and Lipoic Acid in endothelial Dysfunction (ISLAND) study, treatment of MS patients with irbesartan was associated with improved endothelial function, reduced circulating levels of IL-6 and 8-isoprostane (a marker of oxidative stress), as well as a reduction of PAI-1 [133]. However, when pharmacologic

treatment is used to control triglyceride levels as fibrate therapy, it has been shown to improve insulin sensitivity and nitric oxide-mediated vasodilatation, and increase adiponectin concentration [112,114]. Thus, no matter which primary target for intervention is set, this will affect many of the other traits of the MS, suggesting that some common, still unidentified, factor binds most of them together.

If that is the case, the question is when and how to start pharmacological treatment. The advantages of prevention have been already stated. If a strong pathogenic factor were to be identified, it would become a good potential target for treating the MS because targeting it may lead to simultaneous improvement of concomitant disturbances. Antiobesity treatment may offer such an opportunity but there is no proof that all cases of MS are necessarily obesity linked or that effective treatment is still available.

In treating the MS it should also be considered that the single traits may still retain an independent strong cardiovascular risk. As recently proposed by Després, the presence of the MS should not replace the need to assess global cardiovascular risk, but may eventually have to be considered in the global risk assessment together with traditional risk factors, taking into consideration the potential additional contribution of abdominal obesity and/or insulin resistance, and of related metabolic parameters [134]. The recent ADA/EASD recommendation [58] that physicians should assess and treat all cardiovascular risk factors without regard to whether a patient meets the criteria for diagnosis of the MS appears to be a wise one. Support for this view comes from intervention studies, such as the STENO 2. In diabetic patients, the simultaneous control of glucose levels, blood pressure, lipid profile and use of antiaggregant therapy has been shown to reduce the risk of macrovascular complications by 53% [135].

Five-year view

Greater attention to the diagnosis and treatment of MS should be encouraged, both in terms of research and clinical approach. In the future, much effort will be needed to clarify the pathophysiologic mechanisms, the associated cardiovascular risk and the optimal treatment. A unique phenotyping approach based on comprehensive understanding of MS may provide the basis for discovering innovative solutions. Highly specific single, if not multiple assays, for MS-related biomarkers may provide useful tools for improved risk assessment and individualized treatments.

The understanding of the dietary lipid profile and its influence on membrane function, in relation to metabolic dysregulation, has exciting potential for the prevention and treatment of MS. Some studies indicate that diet therapy may require 'personalized nutritional' approaches, wherein particular genetic backgrounds may determine responsiveness of patients to specific dietary fatty acid interventions.

The future holds the promise of drugs that may affect multiple metabolic pathways simultaneously. Even now, such drugs are under investigation, although several safety problems

remain to be solved. Simultaneous activation of PPAR- γ , - α , and - δ has been investigated as a potential path to tackle multiple metabolic disturbances. Dual PPAR agents (PPAR- γ and - α) have been shown to affect energy metabolism in liver, muscle and adipose tissue but their development has been halted because of toxicity. Development of pan-PPARs have been initiated and results are anticipated. Of the many metabolic alterations of the MS, low HDL-cholesterol still remains without a specific and effective treatment. The initial expectation raised by torcetrapib, a cholesteryl ester transfer protein inhibitor, lowered when development was halted because the drug use was associated with an unexpected increase of blood pressure.

As discussed above, treatment of obesity may represent an important opportunity. The identification and understanding of CB1-receptors has opened up a new chapter of intense research, hopefully, resulting in more potent, tolerable and safer products. In the meantime more data will be gathered for a better understanding of the potential of rimonabant. Active research on central regulation of energy balance and appetite control may lead to new therapeutic possibilities.

In the meantime, the concept of MS may turn out to be a simple but efficacious tool for increasing physicians' awareness on T2DM and cardiovascular risk in our modern society. We will all require better understanding and appropriate use of the available pharmacologic therapies.

Key issues

- In the management of metabolic system (MS), the basic therapeutic approach should be focused on lifestyle changes to treat insulin resistance and obesity, to encourage physical activity and a healthier diet. This modification may contribute to reducing the risk of developing both Type 2 diabetes mellitus (T2DM) and cardiovascular disease.
- In obese subjects with MS, even a modest weight reduction (7–10% of bodyweight) should be supported, but pharmacological intervention may be necessary to achieve weight loss and maintenance. Several therapeutic agents are available and some of them have demonstrated benefits.
- In patients with MS and T2DM intensive glucose-lowering therapy should be implemented and a multifactorial approach should be initiated to reduce all cardiovascular risk factors.
- In subjects with MS and dyslipidemia the first goal of treatment should be the reduction of low-density lipoprotein cholesterol. When statins do not achieve recommended lipid targets, a combination therapy should be considered.
- In subjects with MS and hypertension angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers should be the firstline therapy, but all blood pressure lowering agents may be useful in achieving the target and reducing cardiovascular risk.
- In high cardiovascular risk subjects, aspirin treatment should be considered.
- Early aggressive therapy targeting multiple risk factors could potentially have a major impact on cardiovascular prevention.

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
 - of considerable interest
- 1 Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415–1428 (2005).
 - **Interesting overview on the definition, prevalence and mechanisms underlying the metabolic syndrome.**
 - 2 Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome. A summary of the evidence. *Diabetes Care* 28, 1769–1778 (2005).
 - **Evaluates the relative risk of metabolic syndrome for all-cause mortality, cardiovascular disease and diabetes from prospective studies in the general population.**
 - 3 WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes and its complications. Part 1. In *WHO, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Geneva, Switzerland CH (Tech. Resp. Ser. No. 99.2) (1999).
 - 4 Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285, 2486–2497 (2001).
 - 5 Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet* 366, 1059–1062 (2005).
 - 6 Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR *et al.* American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American HeartAssociation/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 112(17), 2735–2752 (2005).
 - 7 Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. Trend in the prevalence of the metabolic syndrome and its impact on cardiovascular disease incidence: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 29, 625–630 (2006).
 - 8 Zhu S, St-Onge MP, Heshka S, Heymsfield SB. Lifestyle behaviours associated with lower risk of having the metabolic syndrome. *Metabolism* 53, 1503–1511 (2004).
 - 9 Webber LS, Bedimo-Rung AL. The obesity epidemic: incidence and prevalence. *J. La State Med. Soc.* 157, S3–S11 (2005).
 - 10 Ferreira I, Twisk JW, van Mechelen W, Kemper HC, Stehouwer CD. Development of fatness, fitness, and lifestyle from adolescence to the age of 36 years: determinants of the metabolic

- syndrome in young adults. The Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *Arch. Intern. Med.* 165, 42–48 (2005).
- 11 Poobalan A, Aucott L, Smith WC *et al.* Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term lipid outcomes – a systematic review. *Obes. Rev.* 5, 43–50 (2004).
- 12 Gregg EW, Gerzoff RB, Thompson TJ, Williamson DF. Intentional weight loss and death in overweight and obese U.S. adults 35 years of age and older. *Ann. Intern. Med.* 138, 383–389 (2003).
- 13 Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG *et al.* for the Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of Type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N. Engl. J. Med.* 34, 1343–1350 (2001).
- **Demonstrates that Type 2 diabetes can be prevented in high-risk subjects by changes in lifestyles.**
- 14 The Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of Type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* 346, 393–403 (2002).
- **Shows that lifestyle changes and treatment with metformin reduce the incidence of diabetes in persons at high risk. The lifestyle intervention was more effective than metformin.**
- 15 Pan XR, Li GW, Hu YH *et al.* Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: the Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 20, 537–544 (1997).
- 16 Lindstrom J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M *et al.* Finnish Diabetes Prevention Study Group. Sustained reduction in the incidence of Type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 368, 1673–1679 (2006).
- 17 Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R *et al.* Diabetes Prevention Program Research Group. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 142, 611–619 (2005).
- 18 Mann JI. Nutrition recommendations for the treatment and prevention of Type 2 diabetes and the metabolic syndrome: an evidenced-based review. *Nutr. Rev.* 64, 422–427 (2006).
- **Proposes evidence-based nutritional recommendations for treatment and prevention of metabolic syndrome.**
- 19 Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* 23, 447–456 (2004).
- **Indicates that the type of dietary fat influences insulin sensitivity and associated metabolic abnormalities.**
- 20 Vessby B, Tengblad S, Lithell H. Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men. *Diabetologia* 37, 1044–1050 (1994).
- 21 Pan DA, Lillioja S, Milner MR *et al.* Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action. *J. Clin. Invest.* 96, 2802–2808 (1995).
- 22 Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K *et al.* KANWU Study. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU study. *Diabetologia* 44, 312–319 (2001).
- 23 Howard BV. Dietary fat as a risk factor for Type 2 diabetes. *Ann. NY Acad. Sci.* 967, 324–328 (2002).
- 24 Ylonen K, Saloranta C, Kronberg-Kippila C, Groop L, Aro A, Virtanen SM; Botnia Dietary Study. Associations of dietary fiber with glucose metabolism in nondiabetic relatives of subjects with Type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *Diabetes Care* 26, 1979–1985 (2003).
- 25 Schulze MB, Liu S, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of Type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 348–356 (2004).
- 26 Freiberg MS, Cabral HJ, Heeren TC, Vasan RS, Curtis Ellison R; Third National Health and Nutrition Examination Survey. Alcohol consumption and the prevalence of the Metabolic Syndrome in the US: a cross-sectional analysis of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 27, 2954–2959 (2004).
- 27 Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M *et al.* American Heart Association Nutrition Committee. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114, 82–96 (2006).
- **Presents recommendations designed to reduce the risk of developing cardiovascular disease.**
- 28 Arif AA, Rohrer JE. Patterns of alcohol drinking and its association with obesity: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *BMC Public Health* 5, 126 (2005).
- 29 Panagiotakos DB, Polychronopoulos E. The role of Mediterranean diet in the epidemiology of metabolic syndrome; converting epidemiology to clinical practice. *Lipids Health Dis.* 4, 7 (2005).
- **Summarizes scientific evidence regarding the effect of the Mediterranean diet on the development of metabolic syndrome.**
- 30 Katzmarzyk PT, Leon AS, Wilmore JH *et al.* Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 1703–1709 (2003).
- **Demonstrates that aerobic exercise training in patients with the metabolic syndrome can be useful as a treatment strategy and provides support for a role for physical activity in the prevention of chronic disease.**
- 31 Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohou C, Kavouras S, Stefanadis C. The associations between physical activity, inflammation, and coagulation markers, in people with metabolic syndrome: the ATTICA study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 12, 151–158 (2005).
- 32 Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5755–5761 (2001).
- 33 Thompson PD, Buchner D, Pina IL *et al.* Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association council on clinical cardiology (subcommittee on exercise, rehabilitation, and prevention) and the council on nutrition, physical activity, and metabolism (subcommittee on physical activity). *Circulation* 107, 3109–3116 (2003).
- 34 Ross R, Dagnone, D, Jones PJ *et al.* Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. *Ann. Intern. Med.* 133, 92–103 (2000).
- 35 Ferrannini E. Is insulin resistance the cause of the metabolic syndrome? *Ann. Med.* 38, 42–51 (2006).
- **Explores the pathophysiological role of insulin resistance in causing the metabolic syndrome.**

- 36 Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among US adults. *Diabetes Care* 27, 2444–2449 (2004).
- 37 Bianchi C, Penno G, Malloggi L *et al.* Non-traditional markers of atherosclerosis potentiate the risk of coronary heart disease in patients with Type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* In press (2006).
- 38 Sherwin RS, Anderson RM, Buse JB *et al.* American Diabetes Association. The prevention or delay of Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26(Suppl. 1), S62–S69 (2003).
- 39 The Diabetes Prevention Program Research Group. Effects of withdrawal from metformin on the development of diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 26, 977–980 (2003).
- 40 Prevention of Type 2 diabetes with Troglitazone in the Diabetes Prevention Program. The Diabetes Prevention Program Research Group. *Diabetes* 54, 1150–1156 (2005).
- 41 Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK *et al.* Preservation of pancreatic B-cell function and prevention of Type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk Hispanic women. *Diabetes* 51, 2796–2803 (2002).
- 42 Xiang AH, Peters RK, Kjos SL *et al.* Effect of pioglitazone on pancreatic β -cell function and diabetes risk in Hispanic women with prior gestational diabetes. *Diabetes* 55, 517–522 (2006).
- 43 Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J *et al.* DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) trial investigators. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 368, 1096–1105 (2006).
- **Concludes that rosiglitazone reduces the incidence of Type 2 diabetes and increases the likelihood of regression to normoglycaemia in adults with impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance or both.**
- 44 Wulfele MG, Kooy A, de Zeeuw D, Stehouwer CD, Gansevoort RT. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in Type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J. Intern. Med.* 256, 1–14 (2004).
- 45 Brame L, Verma S, Anderson T, Lteif A, Mather K. Insulin resistance as a therapeutic target for improved endothelial function: metformin. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 4, 53–63 (2004).
- 46 Vitale C, Mercurio G, Cornoldi A, Fini M, Volterrani M, Rosano GM. Metformin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *J. Intern. Med.* 258, 250–256 (2005).
- 47 Wiernsperger NF. Metformin: intrinsic vasculoprotective properties. *Diabetes Technol. Therapeut.* 2, 259–272 (2000).
- 48 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in over-weight patients with Type 2 diabetes. *Lancet* 352, 854–865 (1998).
- 49 Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC. The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferators-activated receptor agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 1757–1763 (2003).
- 50 Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong AP *et al.* Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 52, 667–674 (2003).
- 51 Choi D, Kim SK, Choi SH *et al.* Preventative effects of rosiglitazone on restenosis after coronary stent implantation in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 2654–2660 (2004).
- 52 Nishio K, Sakurai M, Kusuyama T *et al.* A randomized comparison of pioglitazone to inhibit restenosis after coronary stenting in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29, 101–106 (2006).
- 53 Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ *et al.* PROactive investigators. Secondary prevention of macrovascular events in patients with Type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 366, 1279–1289 (2005).
- **Evidenced that pioglitazone reduces cardiovascular events in patients with Type 2 diabetes at high risk of macrovascular complications.**
- 54 Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci.* 330, 326–335 (2005).
- 55 Belfort R, Harrison SA, Brown K *et al.* A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 355, 2297–2307 (2006).
- **Demonstrates that pioglitazone led to metabolic and histologic improvement in subjects with nonalcoholic steatohepatitis.**
- 56 Lamounier-Zepter V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Insulin resistance in hypertension and cardiovascular disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 355–367 (2006).
- 57 Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome and insulin resistance. *Clin. Cornerstone* 8(Suppl. 1), S21–S27 (2006).
- 58 Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28, 2289–2304 (2005).
- **Extensive review of the literature on the metabolic syndrome's definition. Some criticisms on the definition of the syndrome, pathogenesis and association with cardiovascular disease are discussed.**
- 59 Penno G, Miccoli R, Pucci L, Del Prato S. The metabolic syndrome. Beyond the insulin resistance syndrome. *Pharmacol. Res.* 53, 457–468 (2006).
- 60 Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL *et al.* Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 53, 2087–2094 (2004).
- 61 Schondorf T, Maiworm A, Emmison N, Forst T, Pfutzner A. Biological background and role of adiponectin as marker for insulin resistance and cardiovascular risk. *Clin. Lab.* 51, 489–494 (2005).
- 62 Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults – the evidence report. *Natl Inst. Health Obes. Res.* 2(Suppl. 6), 51S–209S (1998).
- 63 Grundy SM, Hansen B, Smith SC Jr *et al.* Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/ American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* 109, 551–556 (2004).
- 64 Grundy SM, Abate N, Chandalia M. Diet composition and the metabolic syndrome: what is the optimal fat intake? *Am. J. Med.* 113, 255–295 (2002).
- 65 Blackwell J. Identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. *J. Am. Acad. Nurse Pract.* 14, 196–198 (2002).
- 66 Silverstone T. Appetite suppressants. A review. *Drugs* 43, 820–836 (1992).

- 67 Gardin JM, Schumacher D, Constantine G *et al.* Valvular abnormalities and cardiovascular status following exposure to dexfenfluramine or phentermine/fenfluramine. *JAMA* 283, 1703–1709 (2000).
- 68 Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM *et al.* Phenylpropanolamine and the risk of hemorrhagic stroke. *N. Engl. J. Med.* 343, 1826–1832 (2000).
- 69 Finer N. Sibutramine: its mode of action and efficacy. *Int. J. Obes.* 26(Suppl. 4), S29–S33 (2002).
- 70 Thearle M, Aronne LJ. Obesity and pharmacologic therapy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 32, 1005–1024 (2003).
- 71 Padwal R, Li SK, Lau DC. Long-term pharmacotherapy for overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 1437–1446 (2003).
- 72 James WP, Astrup A, Finer N *et al.* Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomised trial. STORM Study Group. Sibutramine Trial of Obesity Reduction and Maintenance. *Lancet* 356, 2119–2125 (2000).
- 73 McNulty SJ, Ur E, Williams G. A randomized trial of sibutramine in the management of obese Type 2 diabetic patients treated with metformin. *Diabetes Care* 26, 125–131 (2003).
- 74 Arterburn DE, Crane PK, Veenstra DL. The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review. *Arch. Intern. Med.* 164, 994–1003 (2004).
- 75 Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjostrom L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of Type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 27, 155–161 (2004).
- 76 Didangelos TP, Thanopoulou AK, Bousboulas SH *et al.* The ORLlistat and Cardiovascular risk profile in patients with metabolic syndrome and Type 2 Diabetes (ORLICARDIA) Study. *Curr. Med. Res. Opin.* 20, 1393–1401 (2004).
- **Demonstrates that orlistat favourably modifies several cardiovascular risk factors in patients with both metabolic syndrome and Type 2 diabetes.**
- 77 Filippatos TD, Kiortsis DN, Liberopoulos EN, Georgoula M, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Effect of orlistat, micronised fenofibrate and their combination on metabolic parameters in overweight and obese patients with the metabolic syndrome: the FenOrli study. *Curr. Med. Res. Opin.* 21, 1997–2006 (2005).
- 78 Black SC. Cannabinoid receptor antagonists and obesity. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5, 389–394 (2004).
- **Evaluates the role of cannabinoid-1 receptor antagonists in the regulation of appetite for the treatment of obesity.**
- 79 Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J; RIO-North America Study Group. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 295, 761–775 (2006).
- 80 Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365, 1389–1397 (2005).
- 81 Despres JP, Golay A, Sjostrom L, for the RIO-Lipids study group. Effect of rimonabant on body weight and the metabolic syndrome in overweight patients. *N. Engl. J. Med.* 353, 2121–2134 (2005).
- 82 Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF; RIO-Diabetes Study Group. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with Type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 368, 1660–1672 (2006).
- 83 Colquitt J, Clegg A, Loveman E, Royle P, Sidhu MK. Surgery for morbid obesity. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD003641 (2006).
- 84 Wei-Jei L, Ming-Te H, Wuu W, Ching-Mei L, Tai-Chi C, I-Ru L. Effects of obesity surgery on the metabolic syndrome. *Arch. Surg.* 139, 1088–1092 (2004).
- 85 Iribarren C, Go AS, Husson G *et al.* Metabolic syndrome and early-onset coronary artery disease: is the whole greater than its parts? *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 1800–1807 (2006).
- 86 Chobanian AV, Bakris GL, Black HR *et al.* National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289, 2560–2572 (2003).
- **Provides an evidence-based approach to the prevention and management of hypertension.**
- 87 Pollare T, Lithell H, Selinus I, Berne C. Sensitivity to insulin during treatment with atenolol and metoprolol: a randomised, double blind study of effects on carbohydrate and lipoprotein metabolism in hypertensive patients. *Br. Med. J.* 248, 1152–1157 (1989).
- 88 Lithell HO. Effect of antihypertensive drugs on insulin, glucose, and lipid metabolism. *Diabetes Care* 14, 203–209 (1991).
- 89 Ames RP. A comparison of blood lipid and blood pressure responses during the treatment of systemic hypertension with indapamide and with thiazides. *Am. J. Cardiol.* 77, 12b–16b (1996).
- 90 Uzunlulu M, Oguz A, Yorulmaz E. The effect of carvedilol on metabolic parameters in patients with metabolic syndrome. *Int. Heart J.* 47, 421–430 (2006).
- 91 Lithell HO. Considerations in the treatment of insulin resistance and related disorders with a new sympatholytic agent. *J. Hypertens. Suppl* 15, S39–S42 (1997).
- 92 Whelton PK, Barzilay J, Cushman WC *et al.* ALLHAT Collaborative Research Group. Clinical outcomes in antihypertensive treatment of Type 2 diabetes, impaired fasting glucose concentration, and normoglycemia: Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Arch. Intern. Med.* 165, 1401–1409 (2005).
- 93 Gerstein HC. Reduction of cardiovascular events and microvascular complications in diabetes with ACE inhibitor treatment: HOPE and MICRO-HOPE. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18(Suppl. 3), S82–S85 (2002).
- 94 Daly CA, Fox KM, Remme WJ, Bertrand ME, Ferrari R, Simoons ML; EUROPA Investigators. The effect of perindopril on cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the EUROPA study: results from the PERSUADE substudy. *Eur. Heart J.* 26, 1369–1378 (2005).
- 95 Solomon SD, Rice MM, Jablonski K *et al.* Prevention of Events with ACE inhibition (PEACE) Investigators. Renal function and effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in patients with chronic stable coronary disease in the Prevention of Events with ACE inhibition (PEACE) trial. *Circulation* 114, 26–31 (2006).

- 96 Kjeldsen SE, Julius S. Hypertension mega-trials with cardiovascular end points: effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers. *Am. Heart J.* 148, 747–754 (2004).
- 97 Luno J, Praga M, de Vinuesa SG. The reno-protective effect of the dual blockade of the renin angiotensin system (RAS). *Curr. Pharm. Des.* 11, 1291–1300 (2005).
- 98 Nickenig G. Should angiotensin II receptor blockers and statins be combined? *Circulation* 110, 1013–1020 (2004).
- 99 Lonn E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 4, 363–372 (2002).
- 100 Pershadsingh HA. Treating the metabolic syndrome using angiotensin receptor antagonists that selectively modulate peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 766–781 (2006).
- 101 Heart Outcomes Prevention Evaluation study investigators. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* 342, 145–153 (2000).
- 102 Heart Outcomes Prevention Evaluation study investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet* 355, 253–259 (2000).
- 103 Yusuf S, Gerstein H, Hoogwerf B *et al.* Ramipril and the development of diabetes. *JAMA* 286, 1882–1885 (2001).
- 104 Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC *et al.* DREAM Trial Investigators. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N. Engl. J. Med.* 355, 1551–1562 (2006).
- 105 Pyorala K, Ballantyne CM, Gumbiner B *et al.* Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Reduction of cardiovascular events by simvastatin in nondiabetic coronary heart disease patients with and without the metabolic syndrome: subgroup analyses of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 27, 1735–1740 (2004).
- 106 Kamalesh M, Rao R, Sawada S, Friend A, Schellhase E, Evans T. Effect of 80 mg/day simvastatin therapy on cardiovascular outcomes in adults with versus without metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* 97, 1487–1489 (2006).
- 107 Deedwania P, Barter P, Carmena R *et al.* Treating to New Targets Investigators. Reduction of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome: analysis of the Treating to New Targets study. *Lancet* 368, 919–928 (2006).
- 108 Ballantyne CM, Blazing MA, Hunninghake DB *et al.* Effect on high-density lipoprotein cholesterol of maximum dose simvastatin and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia: results of the Comparative HDL Efficacy and Safety Study (CHESS). *Am. Heart J.* 146, 862–869 (2003).
- 109 Schuster H, Barter PJ, Stender S *et al.* Effects of switching statins on achievement of lipid goals: Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin Therapy (MERCURY I) study. *Am. Heart J.* 147, 705–712 (2004).
- 110 Stender S, Schuster H, Barter P, Watkins C, Kallend D; MERCURY I Study Group. Comparison of rosuvastatin with atorvastatin, simvastatin and pravastatin in achieving cholesterol goals and improving plasma lipids in hypercholesterolaemic patients with or without the metabolic syndrome in the MERCURY I trial. *Diabetes Obes. Metab.* 7, 430–438 (2005).
- 111 Stalenhoef AF, Ballantyne CM, Sarti C *et al.* A comparative study with rosuvastatin in subjects with metabolic syndrome: results of the COMETS study. *Eur. Heart J.* 26, 2664–2672 (2005).
- **Demonstrates that at equivalent doses, rosuvastatin has a significantly greater effect than atorvastatin in lowering low-density lipoprotein cholesterol and improving the lipid profile in patients with the metabolic syndrome.**
- 112 Denke M, Pearson T, McBride P, Gazzara RA, Brady WE, Tereshakovec AM. Ezetimibe added to ongoing statin therapy improves LDL-C goal attainment and lipid profile in patients with diabetes or metabolic syndrome. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 3, 93–102 (2006).
- 113 Avogaro A, Miola M, Favaro A *et al.* Gemfibrozil improves insulin sensitivity and flow-mediated vasodilatation in Type 2 diabetic patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 603–609 (2001).
- **Suggests that treatment with gemfibrozil improves both insulin action and flow-mediated vasodilatation in Type 2 diabetic patients.**
- 114 Koh KK, Han SH, Quon MJ, Yeal Ahn J, Shin EK. Beneficial effects of fenofibrate to improve endothelial dysfunction and raise adiponectin levels in patients with primary hypertriglyceridemia. *Diabetes Care* 28, 1419–1424 (2005).
- 115 Tenkanen L, Manttari M, Manninen V. Some coronary risk factors related to the insulin resistance syndrome and treatment with gemfibrozil. Experience from the Helsinki Heart Study. *Circulation* 92, 1779–1785 (1995).
- 116 Rubins HB, Robins SJ, Collins D, *et al.* Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 341, 410–418 (1999).
- 117 Keech A, Simes RJ, Barter P *et al.* FIELD study investigators. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with Type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 366, 1849–1861 (2005).
- 118 Rubins HB, Robins SJ, Collins D *et al.* Diabetes, plasma insulin, and cardiovascular disease: subgroup analysis from the Department of Veterans Affairs high density lipoprotein intervention trial (VA-HIT). *Arch. Intern. Med.* 162, 2597–2604 (2002).
- 119 Robins SJ, Rubins HB, Faas FH *et al.* Insulin resistance and cardiovascular events with low HDL cholesterol. *Diabetes Care* 26, 1513–1517 (2003).
- 120 Canner PL, Furberg CD, Terrin ML, McGovern ME. Benefits of niacin by glycemic status in patients with healed myocardial infarction (from the Coronary Drug Project). *Am. J. Cardiol.* 95, 254–257 (2005).
- 121 Grundy SM, Vega GL, McGovern ME *et al.* Diabetes Multicenter Research Group. Efficacy, safety, and tolerability of once-daily niacin for the treatment of dyslipidemia associated with Type 2 diabetes: results of the assessment of diabetes control and evaluation of the efficacy of niaspan trial. *Arch. Intern. Med.* 162, 1568–1576 (2002).
- 122 Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and the risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107, 391–397 (2003).
- 123 Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation* 109, 2818–2825 (2004).
- 124 Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 109(Suppl. 1), II2–II10 (2004).

- 125 van Dielen FM, Buurman WA, Hadfoune M, Nijhuis J, Greve JW. Macrophage inhibitory factor, plasminogen activator inhibitor-1, other acute phase proteins, and inflammatory mediators normalize as a result of weight loss in morbidly obese subjects treated with gastric restrictive surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 4062–4068 (2004).
- 126 Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adams-Huet B, Devaraj S. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy on high sensitive C-peptide protein levels. *Circulation* 103, 1933–1935 (2001).
- 127 Schieffer B, Bunte C, Witte J *et al.* Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 362–368 (2004).
- 128 Nesto R. C-reactive protein, its role in inflammation, Type 2 diabetes and cardiovascular disease, and the effects of insulin-sensitizing treatment with thiazolidinediones. *Diabet. Med.* 21, 810–817 (2004).
- 129 Machado AP. Metabolic syndrome, atherosclerosis and thrombogenic risk. *Rev. Port. Cardiol.* 25, 173–178 (2006).
- 130 Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br. Med. J.* 324, 71–86 (2002).
- 131 Esposito K, Marfella R, Ciotola M *et al.* Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 292, 1440–1446 (2004).
- **Suggests that the Mediterranean-style diet might be effective in reducing the prevalence of the metabolic syndrome and its associated cardiovascular risk.**
- 132 Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med.* 351, 1106–1118 (2004).
- **Describes the current understanding of the mechanisms of action of thiazolidinediones and focuses on their use as hypoglycemic therapies in patients with Type 2 diabetes.**
- 133 Sola S, Mir MQ, Cheema FA *et al.* Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome: results of the Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction (ISLAND) study. *Circulation* 111, 343–348 (2005).
- 134 Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887 (2006).
- **Focuses on abdominal obesity as a marker of 'dysfunctional adipose tissue' and underlines its central importance in clinical diagnosis of metabolic syndrome. Moreover, proposes better risk assessment algorithms to quantify diabetes and cardiovascular disease risk on a global scale.**
- 135 Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with Type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 348, 383–393 (2003).
- **Concludes that an intensified intervention aimed at multiple risk factors in patients with Type 2 diabetes reduces the risk of cardiovascular and microvascular events by approximately 50%.**

Affiliations

- *Cristina Bianchi, MD*
University of Pisa, Department of Endocrinology and Metabolism, Cisanello University Hospital, Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 136
Fax: +39 050 541 521
c.bianchi@ao-pisa.toscana.it
- *Giuseppe Penno, MD*
University of Pisa, Department of Endocrinology and Metabolism, Cisanello University Hospital, Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 137
Fax: +39 050 541 521
pgiuse@immr.med.unipi.it
- *Fabiola Romero, MD*
University of Pisa, Department of Endocrinology and Metabolism
and National University of Asunción, Department of Internal Medicine, Paraguay
Tel.: +39 050 995 101
Fax: +39 050 541 521
fabromi@hotmail.com
- *Stefano Del Prato, MD*
University of Pisa, Department of Endocrinology and Metabolism, Cisanello University Hospital, Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 103
Fax: +39 050 541 521
delprato@immr.med.unipi.it
- *Roberto Miccoli, MD, PhD*
Department of Endocrinology and Metabolism, Ospedale Cisanello, Via Paradisa 2, 56124 Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 103
Fax: +39 050 541 521
rmiccoli@immr.med.unipi.it

Optimizing management of metabolic syndrome to reduce risk: focus on life-style

Cristina Bianchi · Giuseppe Penno · Giuseppe Daniele ·
Luca Benzi · Stefano Del Prato · Roberto Miccoli

Received: 3 May 2007 / Accepted: 9 July 2007 / Published online: 13 February 2008
© SIMI 2008

Abstract The prevalence of metabolic syndrome (MS) is increasing all over the world and its incidence is expected to rise in the next years. Although genetic predisposition appears to play an important role in the regulation of metabolic parameters and in particular of body weight, the rapid increase in the prevalence of obesity and MS suggests that ecological factors (social, economic, cultural and physical environment) are promoting those conditions in susceptible individuals. People with MS are at increased risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease and therefore they represent a priority target for preventive strategies. Life-style modifications based on healthy diet and increased physical activity are an effective preventing and therapeutic approach. Unfortunately, implementation of life-style modification and maintenance of effects is a difficult task both at personal and social level, thus drug therapy can be taken into account.

Keywords Metabolic syndrome · Life-style ·
Insulin-resistance · Type 2 diabetes ·
Cardiovascular disease

Introduction

Obesity (especially abdominal adiposity), hyperglycemia, dyslipidemia, and hypertension are common metabolic traits that, concurrently, constitute the distinctive insulin-

resistance or metabolic syndrome (MS) [1]. The MS is associated with an increased risk of type 2 diabetes (T2DM) and of cardiovascular (CV) disease [2]. The prevalence of MS is increasing all over the world, though its prevalence may vary a lot, swinging from 8% in India to 24% in USA. The incidence of MS is expected to rise in the years to come [3] driven by lifestyle changes [4] and obesity [5]. Because of the epidemiological spreading of the MS and because of his high associated risk, the MS may be seen as public health problem requiring specific preventative actions.

Changes in environment as causes of metabolic syndrome epidemic

Although genetics appear to play an important role in the regulation of metabolic parameters and in particular of body weight [6], the rapid increase in the prevalence of obesity and MS in the world over the past two decades suggests that ecological factors (social, economic, cultural and physical environment) are determining, or at least favouring those conditions.

Social factors

A major energy imbalance in the population has been triggered by dramatic reduction of physical activity and changes in dietary patterns. Thus, the nature of the food supply has changed; foods are more commonly consumed away from home; food advertising, marketing, and promotion has been exploited and food prices dropped [7]. There are more families in which both parents work, and time limitations have become an important factor in

C. Bianchi · G. Penno · G. Daniele · L. Benzi · S. Del Prato ·
R. Miccoli (✉)
Department of Endocrinology and Metabolism,
Section of Diabetes and Metabolism, University of Pisa,
Ospedale Cisanello, Via Paradisa, 2, 56126 Pisa, Italy
e-mail: rmiccoli@immed.unipi.it

determining the types of food consumed. The food industry responds to the family needs by increasing the number of caloric-rich convenience food and pre-cooked meals [8]. Increased consumption of convenience food is associated with reduced eating of fish, fruits, and vegetables. In addition, portion sizes have increased over the past two decades [9], as the per capita availability of added sugar and fat [10]. This food is widely available to children from fast-food restaurants, but also at school and home [11]. Children who regularly eat at fast food have greater calories intake and eat less fruits and vegetables than children not going to fast food restaurants [12, 13]. Surveys carried out in the 1970s, 1980s, and 1990s [14, 15] showed that, in adolescents aged 12–18 years, there is a decrease in the percentage of energy intake from food consumed at home, whereas the proportion of energy intake from restaurant food and fast food has increased over time [13]. The proportion of total daily energy intake of thus adolescents decreased from 74.1% in 1971–1978, to 68.3% in 1989–1991 and to 60.5% in 1994–1996. Concomitantly, fast food consumption increased from 6.5 to 16.7% in the period 1971–1978 to 1989–1991 [14, 15]. Accordingly, money spent on food not consumed at home represented 25% of total food expenditures in 1977–1978, and increased to 40% in 1995 [16]. A similar phenomenon occurs in Italy as well, with an increase of 58.1 billions of euros in 2005, i.e., +2.6% in comparison with the previous year. It has been estimated that in 2008 food consumed away from home will represent 36% of total consumption (<http://www.ISTAT.it>).

Dietary habits

Eating away from home, including restaurant and fast food consumption, is associated with less macro/micro-nutrient intake, worse diet quality, higher energy density and total energy intake and weight gain [17–19]. In two different studies, women with “fast food” or “restaurant” eating patterns tended to have the greatest intakes of energy, total fat, saturated fat, cholesterol, and sodium [20, 21]. Moreover, among young adult of the CARDIA Study, performed between 1985–1986 and 2000–2001, the frequency of visits to fast-food restaurants was correlated with increase in body-weight and insulin-resistance, the two major risk factors for T2DM [22]. While no weight gain was recorded in subjects with infrequent fast-food restaurant use, those with frequent fast-food restaurant visits gained an extra 4.5 kg body-weight and had a two-fold increase in insulin-resistance [23]. The food consumption patterns in the general Dutch population and their association with CV risk factors has been recently determined [24]. Three patterns were identified: the

“cosmopolitan” pattern (greater intake of fried vegetables, salad, rice, chicken, fish, and wine), the “traditional” pattern (greater intake of red meat and potatoes and lesser intakes of low-fat dairy and fruit), and the “refined-foods” pattern (greater intake of French fries, high-sugar beverages, and white bread and less intake of whole-grain bread and boiled vegetables). Traditional and refined-foods pattern were associated with less physical activity and higher body mass index. Independent of other lifestyle factors and body mass index, the cosmopolitan-pattern was associated with lower blood pressure and higher HDL-cholesterol concentrations, while the traditional-pattern was associated with higher blood pressure and higher concentrations of HDL- and total-cholesterol, and glucose. The refined-food-pattern was associated with higher total cholesterol concentrations and lower intake of micronutrients. Similarly, the Malmö Diet and Cancer study [25] demonstrated that dietary patterns dominated by fiber bread (comparatively high in several micronutrients) provide protective effects, while food patterns high in refined bread or cheese, cake, and alcoholic beverages (with lower intakes of several micronutrients) increase the risk for several components of the MS (Table 1).

Exercise and smoking

Life-styles changed dramatically in the past 50 years by modification of urban and suburban space organization, land use, public transportation, free-activity options [52]. The reduction of physical activity in the general population has been attributed to lack of opportunities to walk, as well as to increased access to motorized transport. A review of fourteen studies shows a consistent inverse association between built environment factors (i.e., higher residential density, land mix, and connectivity) and walking or cycling [53]. Walking or bicycling is increasingly uncommon and physical education has been given up in most schools [54]. Special attention may be needed for lower-income and minority communities, which tend to have fewer parks, sport facilities, bike paths, swimming pools, and other places for leisure activity [55]. At the same time, neighbourhoods are increasingly perceived as unsafe for children to play out in, implicitly discouraging active play and forcing children back in front of the television set [56]. The Health Professionals’ Follow-up Study demonstrated that prolonged TV watching is strongly associated with obesity and weight gain, independent of diet and exercise [45], as well as increased risk of T2DM.

Numerous studies showed that the MS and its components are closely associated with lifestyle factors, including low physical activity levels [57, 58]. Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–

Table 1 Effects of dietary factors or physical activity on metabolic syndrome components and associated conditions

| | | | Study/ref. |
|--------------------------------|------------------------------------|--|---|
| Increased intake | | | |
| Daily calories | ↑ body fat accumulation | | Lichtenstein [26] |
| | ↓ central obesity | | Malmo Diet and Cancer cohort [25] |
| | ↑ diabetes risk | | DPS [27], DPP [28] |
| Carbohydrates (mainly refined) | ↓ insulin sensitivity | | Parillo [29] |
| | ↑ triglycerides, ↓ HDL-cholesterol | | Garg [30] |
| | ↑ blood pressure | | Obarzanek [31] |
| Saturated and trans fats | ↓ insulin sensitivity | | Vessby [32] |
| | ↑ diabetes risk | | Howard [132] |
| | ↓ HDL-Cholesterol | | Grundy [33] |
| | ↑ inflammation/thrombosis | | Lopez-Garcia [34], Esposito [35] |
| Alcohol | ↑ plasma cholesterol | | Lichtenstein [26] |
| | ↑ blood pressure | | Appel [36] |
| | ↑ triglycerides | | Kiechl [37] |
| Salt | ↑ blood pressure | | Appel [36] |
| Reduced intake | | | |
| Fibers | ↓ insulin sensitivity | | Weickert [38] |
| | ↑ plasma insulin levels | | Malmo Diet and Cancer cohort [25] |
| | ↑ triglycerides | | Brown [39] |
| Monounsaturated fats | ↓ HDL-Cholesterol | | Appel [36] |
| | ↓ insulin sensitivity | | Prillo [40] |
| | ↑ cardiovascular risk | | de Logeril [41] |
| ω -3 fatty acids | ↑ cardiovascular risk | | Psota [42] |
| | ↑ triglycerides | | Balk [43] |
| | ↑ inflammation/thrombosis | | Giugliano [44] |
| Reduced physical activity | | | |
| | ↑ body fat accumulation | | Hu [45] |
| | ↓ insulin sensitivity | | Henriksen [46] |
| | ↑ blood pressure | | Whelton [47] |
| | ↑ triglycerides | | Thompson [48] |
| | ↓ HDL-cholesterol | | Huttunen [49] |
| | ↑ cardiovascular risk | | Hu [50], Hu [51] |
| | ↑ diabetes risk | | DPS [27], DPP [28], Da Qing Study [102] |

2000 show that MS prevalence was higher among subjects with sedentary habits such as TV watching or computer use [59]. Among French adults, the frequency of many MS components increased as a function of the time spent in front of a screen and decreased with increasing physical activity levels [60]. The likelihood to have MS, decreased by one-third with moderate physical activity and by two-thirds with vigorous physical activity even after adjustment for age, education, and smoking, [odds ratio (95% CI), 0.34 (0.17–0.66) in women, 0.44 (0.28–0.68) in men] compared with subjects with insufficient physical activity. In women, independently of physical exercise, time spent in front of a screen was positively associated with the likelihood to have the MS [odds ratio (95% CI), 3.30 (2.04–5.34)].

Another important environmental factor for MS is cigarette smoking. Though the trend of cigarette smoking is declining in adults [61], smoking rate among high school students has recently started to increase [62]. Several studies have demonstrated a clear association between smoking habits and educational level [63, 64]. Smoking is known to be independently associated with CV risk, and seems to have an adverse effect on several components of MS [65–67]. Smoking acutely impairs glucose tolerance and insulin sensitivity, reduces HDL-cholesterol and increases triglyceride levels, and raises blood pressure and heart rate [68]. Moreover, a dose-dependent effect exists between prevalence of the MS and the number of cigarettes smoked [69].

Metabolic syndrome as risk factor for type 2 diabetes and cardiovascular disease

Several studies have shown that MS is a strong predictor of incident T2DM. Both WHO and ATP III definitions for MS can predict incident T2DM in the general population [70, 71]. The prevalence of MS increases along with deterioration of glucose regulation going from 22% in subjects with normal glucose tolerance (NGT) to 75% in those with combined impaired fasting glucose (IFG) and impaired glucose tolerance (IGT) [72] (Fig. 1). Recently, Ford reviewed prospective studies from 1998 through 2004 on MS and reported that the relative risk for T2DM in individuals with MS, as defined by NCEP ATP III, was 2.99 (1.96–4.57) [73]. The same analysis indicated that the relative risk for CV disease and all-cause mortality in subjects with MS was 1.65 (95% CI, 1.38–1.99) and 1.27 (0.90–1.78), respectively. MS comprises a cluster of abnormalities that occur as a result of perturbations in multiple metabolic pathways, leading to hyperinsulinemia, insulin-resistance, hyperglycemia, atherogenic dyslipidemia, and hypertension. Recent findings suggest that obesity and MS are pro-inflammatory conditions, characterized by elevations of serum high-sensitivity C-reactive protein [74, 75]. Atherothrombotic factors also are increased in MS: these include increased levels of plasminogen activator inhibitor-1, serum fibrinogen, von Willebrand factor, factor VII, and thrombin, as well as increased platelet activation and aggregation [76]. Several studies demonstrated that MS is associated with significant increase in the risk of CV morbidity and mortality [77–79]. Data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey indicated that MS is associated with increased risk of myocardial infarction and stroke [77]. This finding is in agreement with a study from Finland that examined the relationship between MS and CV disease and overall mortality rate in middle-aged men participating

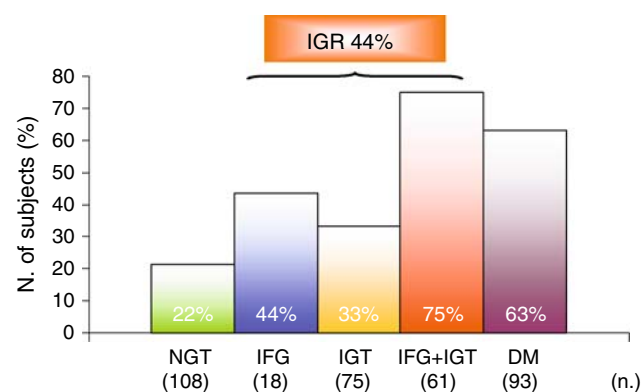


Fig. 1 Prevalence of metabolic syndrome by glucose tolerance categories. *IGR* impaired glucose regulation, *NGT* normal glucose tolerance, *IFG* impaired fasting glucose, *IGT* impaired glucose tolerance, *DM* diabetes mellitus

in the population-based Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study [78]. In the Botnia Study, the risk for coronary heart disease and stroke was increased threefold and CV mortality was markedly increased in subjects with MS (12.0 vs. 2.2%; $P < 0.001$) [80]. In another population-based study the risk of incident CV disease, over a 5-year observational period, increased with the number of components of MS being more than 5-fold greater in subjects with four or more MS components compared with those with only one component [79]. In the ARIC Study, after adjustment for age, smoking, LDL cholesterol and ethnicity, subjects with MS were 1.5 and 2 times more likely to develop coronary heart disease and ischemic stroke than control subjects. Furthermore, in patients with a history of myocardial infarction, the presence of the MS is associated with increased risk of death and major CV events [81]. In addition, a high prevalence of the MS (46%) was recently reported in patients with atherosclerotic disease (coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral artery disease, or abdominal aortic aneurysm) [82]. Even in patients with overt T2DM, the presence of the MS is associated with an almost fivefold increase in CV risk [83–85].

On the light of these data, MS may provide a simple but useful tool to recognize subjects at high risk for T2DM and CV disease. However, as recently proposed by Després [86] and by the ADA/EASD joint document [87], the presence of the MS should not be a reason for not assessing global CV risk. Rather, in defining the risk, traditional risk factors, as well as potential additional contribution of abdominal obesity and/or insulin resistance and of related metabolic abnormalities, should be promptly considered for an intensive and appropriate treatment.

Benefits of life-style modifications

Since MS can be considered as a T2DM and CV risk factor, the obvious consequence is that people with the syndrome should be identified earlier in order to put at work appropriate preventative strategies (Fig. 2). To this purpose periodical physical examination (including waist circumference measurement) and routine laboratory parameters should be implemented [88].

Given the main effect changes in life-style exerts on the growing incidence of MS, it is obvious that the main goal of preventative actions should promote a modest weight reduction and regular physical activity (Fig. 3).

Modest weight loss can indeed significantly improve all aspects of the MS such as lipid profile, glucose tolerance, blood pressure, and insulin sensitivity [89]. A realistic goal for weight reduction is a 7–10% body weight loss over 6–12 months period. Long-term maintenance of weight loss is best achieved when regular exercise is included in the

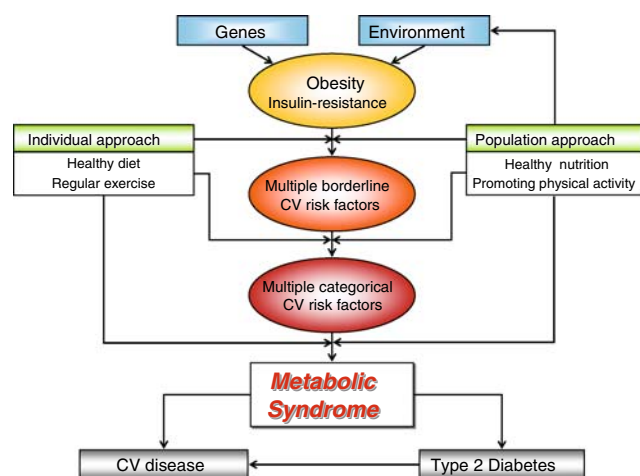


Fig. 2 Strategies for changes of life-style in subjects with metabolic syndrome

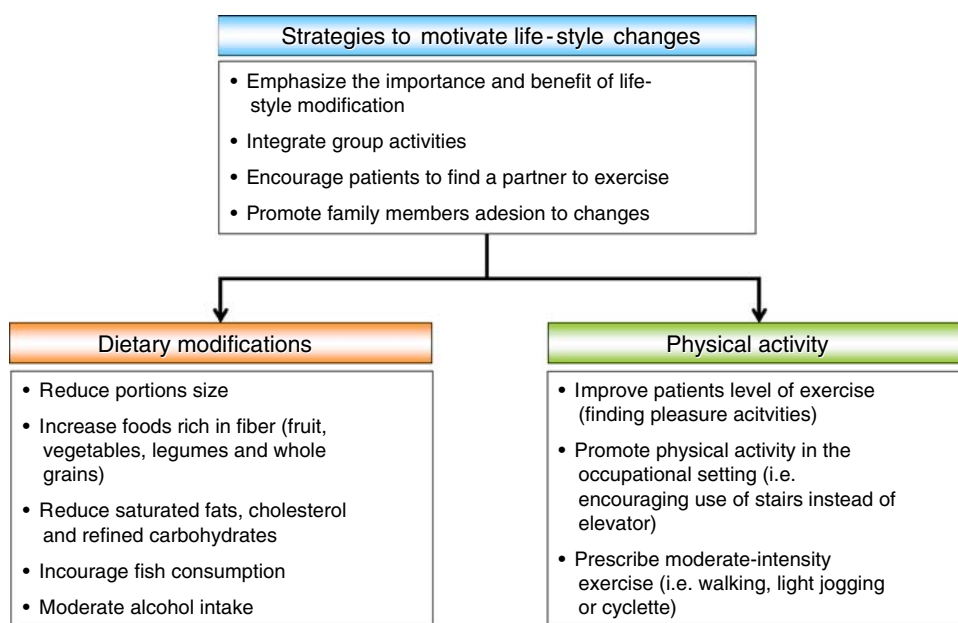
weight-reduction regimen. Physical activity can exert its protective effects on the MS through improvements in plasma lipid concentrations, particularly increasing HDL cholesterol [90, 91] and decreasing triglycerides [92, 93]. In addition, physical exercise lowers blood pressure [94], improves glucose tolerance [95, 96] and insulin sensitivity [97, 98], and reduces the risk of developing T2DM [99, 100].

The aim of the HERITAGE Family Study [101] was to determine the efficacy of exercise training in treating the MS. The study population included 621 sedentary and apparently healthy individuals. In this group of people the MS prevalence was 16.9%. After exercise training, 30.5% of the subjects with MS at baseline did no longer meet the

diagnostic criteria for MS, suggesting that aerobic exercise can be a useful treatment strategy.

Three studies, the Finnish Diabetes Prevention Study (DPS) [27], the Diabetes Prevention Program (DPP) [28] and the Da Qing Trial [102], have documented the benefits of therapeutic lifestyle change in individuals with impaired glucose tolerance (IGT). These studies have shown that as little as a 10% body weight reduction and regular physical activity can reduce the risk of developing T2DM by more than 50%. Moreover, after 3.2 years of lifestyle intervention, the incidence of MS was much lower than the one observed in the placebo group ($P < 0.001$) [103]. Furthermore, among participants who did not have MS at baseline (47%), the incidence of the MS during follow-up was reduced by 41% with lifestyle intervention ($P < 0.001$) compared to placebo [104]. In agreement with these data are the results of the Oslo Diet and Exercise Study that evaluated the single and combined effects of diet and exercise intervention on MS. After 1 year, as compared with control group, fasting glucose decreased significantly in the diet alone group as well as in the diet plus exercise group. Moreover, in a subgroup analysis of good responders, favourable changes have been observed with respect to total and HDL cholesterol, triglycerides, systolic and diastolic blood pressure [104]. Both dietary and exercise intervention had significant effects on the reduction of cases with MS (MS prevalence -35.3 and -23.5% , respectively; $P < 0.005$ vs. control group) in a group of 137 middle-aged males [105]. Finally, combination of diet and exercise was more effective than diet or exercise alone in the treatment of the MS (-67.4%) (Table 2).

Fig. 3 Individual and population approaches to prevent and treat metabolic syndrome by life-style changes



Healthy diet and promotion of physical activity

Diet in industrialized countries is rich in calories, saturated fat, dietary cholesterol and refined grains. Specific dietary changes are needed for people with MS. This must include reduction of saturated fat intake to lower insulin-resistance, reduction of sodium intake to lower blood pressure, and reduction of high-glycemic index carbohydrate intake to lower triglyceride levels. Such a diet should include more fruits, vegetables, whole grains, monounsaturated fats, and low-fat dairy products.

Recently, evidence-based nutritional recommendations for treatment and prevention of MS have been proposed [125]. According to these recommendations, protein should contribute for 10–20% of total daily energy; saturated fatty acids and *trans* unsaturated fatty acids should be lower than 10% of total energy and further lowered to <8% if serum LDL-cholesterol level is increased; cholesterol intake should be 300 mg or less per day; carbohydrate should range between 45–60% of total energy expenditure. However, in the scientific community the proportion of macronutrients (i.e., protein, fat, and carbohydrates) is still a matter of debate so that it may be advisable to focus on each patient's specific metabolic alterations when offering dietary advice [126].

Bravata et al. published a meta-analysis on the effects of low-carbohydrate diets in obese patients showing that weight loss was associated with longer diet duration and decreased caloric intake, but not with reduced carbohydrate content [127]. In morbidly obese patients with high prevalence of T2DM or MS, a low-carbohydrate diet seems associated to a greater weight loss but also to a higher rate of drop-out in comparison to a low-fat diet [128–130]. Even if low-fat diet may be less tasting, reduction of saturated fats may be useful to improve insulin sensitivity since increased level of free fatty acid, and the saturated to unsaturated fatty acids proportion plays an important role in the development and maintenance of insulin-resistance [131]. The KANWU multicenter study [32] has shown that shifting from a diet rich in saturated fatty acids to one rich in monounsaturated fat improves insulin sensitivity in healthy people, an effect that is not exerted by moderate ω -3 fatty acid supplementation. Finally, diets higher in saturated fat have been claimed to increase T2DM risk as compared to those higher in unsaturated fat [132].

Food rich in dietary fiber is strongly recommended, with a total dietary fibre intake ≥ 40 g/d (or 20 g/1,000 kcal/die), and about half of them in their soluble form. Vegetables, legumes, fruits, and whole-grain cereals represent the most appropriate sources of carbohydrates. Several studies have shown that high intake of dietary fiber is associated with enhanced insulin sensitivity, while diets high in rapidly absorbed carbohydrates and low in cereal

fiber are associated with increased risk of T2DM [133, 134]. In a cross-sectional study among participants of the Framingham Offspring Study [115], whole grain and cereal fiber intakes were associated with reduced risk of MS, with cereal fiber accounting for most of the whole grain effect. Higher glycemic index was associated with higher risk of MS, while no association was observed for glycemic load, total carbohydrate intake, refined grain intake, or other sources of dietary fiber.

Diets rich in fruits, vegetables and including low-fat dairy products, whole grains, poultry, fish and nuts, with decreased amounts of red meat, sweets, sugar, cholesterol, total and saturated fat, i.e., a diet very similar to DASH diet, has been associated with lower blood pressure values [135]. Sodium restriction can reduce systolic blood pressure and enhance blood pressure-lowering effect of other dietary manipulations or pharmacologic treatment. In the low-sodium DASH trial [136] reduction of sodium intake from high to intermediate level significantly lowered systolic blood pressure, while reducing sodium intake from intermediate to low level was accompanied by additional reduction. Hence, salt intake should not exceed 6 g/day, with the possibility of further restriction for patients with elevated blood pressure. Studies such as DASH [135] and PREMIER [137] have shown that moderate alcohol consumption can reduce systolic blood pressure. Moreover, moderate alcohol intake has been associated with lower prevalence of MS, favourable influence on lipids, waist circumference, and fasting insulin [138]. Still, alcoholic beverages should be limited to no more than 2 drinks per day for men and 1 drink per day for women usually taken during meals [26]. Greater alcohol consumption has been associated with high risk of overweight and obesity [139].

The DASH diet resulted in a significant improvement of all components of MS [119]. The DASH diet is very similar to the Mediterranean diet, and the results are in agreement with previous findings obtained over a longer period of time (24 months) by Esposito et al. [35]. In this study, participants on Mediterranean diet showed a reduction in the number of the components of the syndrome and a drop in the MS prevalence approximately by half [35]. Consumption of the Mediterranean diet by patients with MS was associated with improvement of endothelial function and reduction of markers of systemic vascular inflammation [35]. Of relevance the observation that the Mediterranean diet has been related with low mortality [140], low prevalence of metabolic disorders (like obesity, and high blood pressure), as well as low incidence of coronary heart disease [141] is of relevance.

Exercise is a key component of effective treatment in patients with MS. individuals should be encouraged to improve their level of physical activity. The greatest health benefits occur when sedentary persons incorporate

Table 2 Effects of dietary habits and physical activity in prevention and treatment of metabolic syndrome and its components

| | Study/ref. | Design | Sample | Outcome |
|---|----------------------------|---|---|-------------------------------------|
| Central obesity | | | | |
| Low energy diet + exercise | Lofgren [106] | Intervention Follow up: 10 weeks | 70 premenopausal women | ↓ BMI, ↓ waist, ↓ insulin, ↓ leptin |
| Mediterranean diet | ATTICA Study [107] | Cross sectional | 2,282 Greek adults | ↓ risk of MS |
| High fiber intake | IRAS Study [108] | Cross sectional | 980 middle-age adults | ↓ waist |
| High complex carbohydrate intake | Halkjaer J [109] | Prospective follow-up: 6 years | 2,300 adults | ↓ waist |
| Increased trans fats intake | Koh-Banerjee [110] | Prospective; follow-up: 9 years | 16,587 US men | ↑ waist |
| Blood pressure | | | | |
| DASH diet | Lopes [111] | Intervention follow-up: 8 weeks | 12 obese hypertensive 12 lean normotensive | ↓ blood pressure |
| Sodium intake reduction | He [112] | Intervention, cross-over, double-blind follow-up: 1 month | 112 hypertensive adults | ↓ blood pressure |
| High potassium intake | NHANES III [113] | Cross sectional | 17,030 US adults | ↓ blood pressure |
| Moderate alcohol intake | Zilkens [114] | Intervention, cross-over follow-up: 4 weeks | 28 men | ↑ blood pressure |
| Insulin resistance and diabetes | | | | |
| High whole grain intake | Framingham [115] | Cross sectional | 2,834 adults | ↓ HOMA-IR, ↓ MS |
| High fiber intake | IRAS Study [116] | Cross sectional | 979 adults | ↑ insulin sensitivity |
| Replacing saturated fats with MUFA | KANWU Study [32] | Intervention; follow-up: 3 months | 162 healthy subjects | ↑ insulin sensitivity |
| Increased dairy intake | HPFS [117] | Prospective; follow-up: 12 years | 41,254 men | ↑ risk of diabetes |
| Healthier diet + physical activity | DPS [27] | Intervention; follow-up: 3 years | 522 IGT subjects | ↓ risk of diabetes |
| | DPP [28] | Intervention | 3,234 IFG/IGT subjects | ↓ risk of diabetes |
| | DPP [103] | Follow-up: 3 years | | ↓ MS |
| Exercise | Da Qing Study [102] | Intervention; follow-up: 2 years | 577 IGT subjects | ↓ risk of diabetes |
| Dyslipidemia | | | | |
| Low carbohydrate diet | Stern [118] | Intervention; follow-up: 1 year | 132 obese | ↓ triglycerides, ↑ HDL-C |
| DASH diet | Azadbahr [119] | Intervention follow-up: 6 months | 116 subjects with MS | ↓ triglycerides ↑ HDL-C |
| High glycemic index and high glucose load foods | Nurses' Health Study [120] | Cross sectional | 280 women | ↑ triglycerides ↓ HDL-C |
| Increased intake of ω -3 fatty acids | Finnegan [121] | Intervention follow-up: 6 months | 150 moderately hyperlipidemic subjects | ↓ triglycerides |
| Inflammation | | | | |
| Mediterranean diet | Esposito [35] | Intervention; follow-up: 2 years | 180 subjects with MS | ↓ CRP, ↓ IL-6, ↓ IL-7, ↓ IL-8 |
| Physical activity | | | | |
| Aerobic exercise training | HERITAGE Study [122] | Intervention follow-up: 20 weeks | 621 sedentary healthy adults | ↓ MS |

Table 2 continued

| | Study/ref. | Design | Sample | Outcome |
|---|---------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Leisure-time physical exercise | Hu [51] | Prospective; follow-up: 19 years | 47,840 adults | ↓ CVD |
| | Berengo [123] | Prospective; follow-up: 20 years | 32,677 adults | ↓ CVD and total mortality |
| Vigorous vs. moderate physical activity | Laaksonen [124] | Prospective follow-up: 4 years | 612 subjects without MS | ↓ MS |
| Standing or walking around home | Nurses' Health Study [45] | Prospective follow-up: 6 years | 50,277 women | ↓ obesity ↓ risk of diabetes |

MS metabolic syndrome, CVD cardiovascular disease, MUFA monounsaturated fatty acids

moderate-intensity exercise into their lifestyle. Unfortunately, studies have shown that compliance declines as recommended frequency of exercise increases [142]. Guidelines recommend regular and moderate regimens for exercise [143] such as 30-min per day of moderate-intensity physical activity. Increasing the level of physical activity (e.g., 1-hr daily) further enhances beneficial effects. One-hour a day walking or light jogging favours significant losses of abdominal (visceral) fat when performed in a non-restricted diet regimen [144]. Interestingly, beneficial effects on cardio-protection are achieved not only by leisure-time exercise, but also by physical activity in the occupational setting [145].

Efforts and commitments to promote smoking cessation, above all among young people, should be adopted. Programs on smoking cessation should especially concentrate on persons of lower educational level due to the fact that this habit is more common among people with lower educational level [63]. Benefit of smoking cessation are apparent as far as increase in HDL-cholesterol levels is considered, while no effect on glucose tolerance has been observed [146]. Body weight gain upon smoking cessation may vanish the beneficial effect, stressing the need for even stronger life-style modification in these subjects.

Conclusions

Given the widespread occurrence of MS, there is no doubt that treatment of MS should strongly lie on preventative programs aiming at life-style modification. Several intervention studies have demonstrated the beneficial effect of body weight control, healthy diet and regular physical activity. On a practical ground, a 10% reduction in body weight should be sought in all overweight subjects, a Mediterranean diet encouraged and 30 min walking a day implemented in everybody. As simple these measures may look, their effective implementation and maintenance still represent a formidable challenge. So, pharmacological intervention often represents a necessary option. In the

DPP, metformin use in IGT subjects was associated with significant reduction of conversion to T2DM [28] and incidence of MS [103].

Given the serious health consequences of metabolic syndrome and its economic impact, greater attention must be directed to the prevention, identification, and treatment of underlying risk factors, mainly overweight and obesity. Primary prevention of metabolic syndrome cannot be accomplished without major lifestyle changes within society.

References

1. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005) The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415–1428
2. Ford ES (2005) Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome. A summary of the evidence. *Diabetes Care* 28:1769–1778
3. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM (2006) Trend in the prevalence of the metabolic syndrome and its impact on cardiovascular disease incidence: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 29:625–630
4. Zhu S, St-Onge MP, Heshka S, Heymsfield SB (2004) Lifestyle behaviors associated with lower risk of having the metabolic syndrome. *Metabolism* 53:1503–1511
5. Webber LS, Bedimo-Rung AL (2005) The obesity epidemic: incidence and prevalence. *J La State Med Soc* 157:S3–S11
6. Bouchard C, Tremblay A (1997) Genetic influences on the response of body fat and fat distribution to positive and negative energy balances in human identical twins. *J Nutr* 127(suppl. 5):943S–947S
7. French SA, Story M, Jeffrey RW (2001) Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health* 22:309–335
8. Schluter G, Lee C (1999) Changing food consumption patterns: their effects on the US food system, 1972–92. *Food Rev* 22:35–37
9. French SA (2003) Pricing effects on food choices. *J Nutr* 133:841S–843S
10. Drewnoski A (2003) Fat and sugar: an economic analysis. *J Nutr* 133:838S–840S
11. French SA, Lin BH, Guthrie JF (2003) National trend in soft drink consumption among children and adolescents age 6 to 17 years: prevalence, amounts, and sources, 1977/1978 to 1994/1998. *J Am Diet Assoc* 103:1326–1331

12. Bowman SA, Gortmaker SL, Ebbeling CB et al (2004) Effects of fast-food consumption on energy intake and diet quality among children in a national household survey. *Pediatrics* 113:112–118
13. French SA, Story M, Neumark-Sztainer D et al (2001) Fast food restaurant use among adolescents: Associations with nutrient intake, food choices and behavioral and psychosocial variables. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1823–1833
14. Jahns L, Siega-Riz AM, Popkin BM (2001) The increasing prevalence of snacking among US children from 1977 to 1996. *J Pediatr* 138:493–498
15. Nielson SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM (2002) Trends in food locations and sources among adolescents and young adults. *Prev Med* 35:107–113
16. Lin BH, Guthrie JF, Frazao E (1999) Nutrient contribution of food away from home. In: Frazao E (ed) *America's eating habits: changes and consequences*. US Department of Agriculture, Washington pp 213–242
17. Thompson OM, Ballew C, Resnicow K, Must A, Bandini LG, Cyr H et al (2004) Food purchased away from home as a predictor of change in BMI z-scores among girls. *Int J Obes* 28:282–289
18. McCrory M, Fuss P, Hays N, Vinken A, Greenberg A, Roberts S (1999) Overeating in America: association between restaurant food consumption and body fatness in healthy men and women ages 19 to 80. *Obes Res* 7:564–571
19. Satia JA, Galanko J, Siega-Riz AM (2004) Eating at fast-food restaurants is associated with dietary intake, demographic, psychosocial and behavioural factors among African Americans in North Carolina. *Pub Health Nutr* 7:1089–1096
20. Haines PS, Hungerford DW, Popkin BM, Guilkey DK (1992) Eating patterns and energy and nutrient intakes of US women. *J Am Diet Assoc* 92:698–704
21. French S, Harnack L, Jeffery R (2000) Fast food restaurant use among women in the Pound of Prevention Study: dietary, behavioral and demographic correlates. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1353–1359
22. Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slattery ML, Jacobs DR Jr, Ludwig DS (2005) Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet* 365:36–42. Erratum in: *Lancet* 365:1030 (2005)
23. Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slattery ML, Jacobs DR Jr, Ludwig DS (2005) Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet* 365:36–42. Erratum in: *Lancet* 365:1030 (2005)
24. van Dam RM, Grievink L, Ocke MC, Feskens EJ (2003) Patterns of food consumption and risk factors for cardiovascular disease in the general Dutch population. *Am J Clin Nutr* 77:1156–1163
25. Wirfalt E, Hedblad B, Gullberg B, Mattisson I, Andren C, Rosander U et al (2001) Food patterns and components of the metabolic syndrome in men and women: a cross-sectional study within the Malmo Diet and Cancer cohort. *Am J Epidemiol* 154:1150–1159
26. American Heart Association Nutrition Committee, Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J (2006) Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114:82–96
27. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukkaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, Finnish Diabetes Prevention Study Group (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343–1350
28. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM, Diabetes Prevention Program Research Group (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393–403
29. Parillo M, Rivellese AA, Ciardullo AV, Capaldo B, Giacco A, Genovese S, Riccardi G (1992) A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 41:1373–1378
30. Garg A, Grundy SM, Unger RH (1992) Comparison of effects of high and low carbohydrate diets on plasma lipoproteins and insulin sensitivity in patients with mild NIDDM. *Diabetes* 41:1278–1285
31. Obarzanek E, Sacks FM, Vollmer WM, Bray GA, Miller ER 3rd, Lin PH, Karanja NM, Most-Windhauser MM, Moore TJ, Swain JF, Bales CW, Proschan MA, DASH Research Group (2001) Effects on blood lipids of a blood pressure-lowering diet: the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Trial. *Am J Clin Nutr* 74:80–89
32. Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nalsen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH, KANWU Study (2001) Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU study. *Diabetologia* 44:312–319
33. Grundy SM, Abate N, Chandalia M (2002) Diet composition and the metabolic syndrome: what is the optimal fat intake? *Am J Med* 113(Suppl 9B):25S–29S
34. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB (2005) Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr* 135:562–566
35. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D (2004) Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 292:1440–1446
36. Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER 3rd, Conlin PR, Erlinger TP, Rosner BA, Laranjo NM, Charleston J, McCarron P, Bishop LM, OmniHeart Collaborative Research Group (2005) Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *JAMA* 294:2455–2464
37. Kiechl S, Willeit J, Poewe W, Egger G, Oberhollenzer F, Muggeo M, Bonora E (1996) Insulin sensitivity and regular alcohol consumption: large, prospective, cross sectional population study (Bruneck study). *BMJ* 313:1040–1044
38. Weickert MO, Mohlig M, Schoff C, Arafat AM, Otto B, Viehoff H, Koebnick C, Kohl A, Spranger J, Pfeiffer AF (2006) Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care* 29:775–780
39. Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM (1999) Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 69:30–42
40. Parillo M, Giacco A, Ciardullo AV, Rivellese AA, Riccardi G (1996) Does a high-carbohydrate diet have different effects in NIDDM patients treated with diet alone or hypoglycemic drugs? *Diabetes Care* 19:498–500
41. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors,

- and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99:779–785
42. Psota TL, Gebauer SK, Kris-Etherton P (2006) Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 98:3i–18i
 43. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J (2006) Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 189:19–30
 44. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K (2006) The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol* 48:677–685
 45. Hu FB, Li TY, Colditz GA, Willett WC, Manson JE (2003) Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA* 289:1785–1791
 46. Henriksen EJ (2002) Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol* 93:788–796
 47. Whelton SP, Chin A, Xin X, He J (2002) Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med* 136:493–503
 48. Thompson PD, Rader DJ (2001) Does exercise increase HDL cholesterol in those who need it the most? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1097–1098
 49. Huttunen JK, Lansimies E, Voutilainen E, Ehnholm C, Hietanen E, Penttilä I, Siitonen O, Rauramaa R (1979) Effect of moderate physical exercise on serum lipoproteins. A controlled clinical trial with special reference to serum high-density lipoproteins. *Circulation* 60:1220–1229
 50. Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE (2004) Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med* 351(26):2694–703
 51. Hu G, Jousilahti P, Borodulin K, Barengo NC, Lakka TA, Nissinen A, Tuomilehto J (2006) Occupational, commuting, leisure-time physical activity in relation to coronary heart disease among middle-aged Finnish men and women. *Atherosclerosis* 2006 (Epub ahead of print) PMID:16979645
 52. Handy SL, Boarnet MG, Ewing R, Killingsworth RE (2002) How the built environment affects physical activity: Views from urban planning. *Am J Prev Med* 23:64–73
 53. Saelens BE, Sallis JF, Frank LD (2003) Environmental correlates of walking and cycling: findings from the transportation, urban design, and planning literatures. *Ann Behav Med* 25:80–91
 54. Burgeson CR, Wechsler H, Brener ND, Young JC, Spain CG (2001) Physical education and activity: Results from the School Health Policies and Programs Study 2000. *J Sch Health* 71:279–293
 55. Powell LM, Slater S, Chaloupka FJ (2004) The relationship between community physical activity settings and race, ethnicity and socioeconomic status. *Evid Based Prev Med* 1:135–144
 56. Gorely T, Marshall SJ, Biddle SJH (2004) Couch kids: Correlates of television viewing among youth. *Int J Behav Med* 11:152–163
 57. Carroll S, Dudfield M (2004) What is the relationship between exercise and metabolic abnormalities? A review of the metabolic syndrome. *Sports Med* 34:371–418
 58. Eriksson J, Taimela S, Koivisto VA (1997) Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia* 40:125–135
 59. Ford ES, Kohl HW 3rd, Mokdad AH, Ajani UA (2005) Sedentary behavior, physical activity, and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Obes Res* 13:608–614
 60. Bertrais S, Beyeme-Ondoua JP, Czernichow S, Galan P, Hercberg S, Oppert JM (2005) Sedentary behaviors, physical activity, and metabolic syndrome in middle-aged French subjects. *Obes Res* 13:936–944
 61. Stat bite: Trends in cigarette smoking among adults, 1965–2001. *J Natl Cancer Inst* (2004);96:506
 62. Office on Smoking, Health, Division of Adolescent and School Health National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention (2002) Trends in cigarette smoking among high school students—United States, 1991–2001. *J Sch Health* 72:226–228
 63. Rohrmann S, Becker N, Kroke A, Boeing H (2003) Trends in cigarette smoking in the German centers of the European Prospective Investigation into Cancer, Nutrition (EPIC): the influence of the educational level. *Prev Med* 36:448–454
 64. Giskes K, Kunst AE, Benach J, Borrell C, Costa G, Dahl E et al (2005) Trends in smoking behaviour between 1985 and 2000 in nine European countries by education. *J Epidemiol Community Health* 59:395–401
 65. Dzien A, Dzien-Bischinger C, Hoppichler F, Lechleitner M (2004) The metabolic syndrome as a link between smoking and cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab* 6:127–132
 66. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB (2003) The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Arch Intern Med* 163:427–436
 67. Lee WY, Jung CH, Park JS, Rhee EJ, Kim SW (2005) Effects of smoking, alcohol, exercise, education, and family history on the metabolic syndrome as defined by the ATP III. *Diabetes Res Clin Pract* 67:70–77
 68. Frati AC, Iniestra F, Ariza CR (1996) Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* 19:112–118
 69. Oh SW, Yoon YS, Lee ES, Kim WK, Park C, Lee S et al (2005) Association between cigarette smoking and metabolic syndrome: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (Brief Report). *Diabetes Care* 28:2064–2066
 70. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA (2002) Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 156:1070–1077
 71. Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM (2004) Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care* 27:2676–2681
 72. Miccoli R on behalf of the GENFIEV Study Group (2006) Relationship between insulin-resistance, metabolic syndrome and altered glucose tolerance. The GENFIEV Study. *Diabetologia* 49(Suppl 1):742
 73. Ford ES (2005) Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* 28:1769–1778
 74. Grundy SM (2002) Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation* 105:2696–2698
 75. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N (2003) C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107:391–397
 76. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA (2003) Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation* 108:1527–1532
 77. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS (2003) Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 109:42–46

78. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA et al (2002) The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288:2709–2716
79. Klein BE, Klein R, Lee KE (2002) Components of the metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease and diabetes in Beaver Dam. *Diabetes Care* 25:1790–1794
80. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T et al (2001) Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683–689
81. Levantesi G, Macchia A, Marfisi R et al (2005) Metabolic syndrome and risk of cardiovascular events after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 46:277–283
82. Gorter PM, Olijhoek JK, van der Graaf Y et al (2004) Prevalence of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 173:363–369
83. Bonora E, Targher G, Formentini G et al (2004) The Metabolic Syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in Type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabet Med* 21:52–58
84. Isomaa B, Henricsson M, Almgren P, Tuomi T, Taskinen MR, Groop L (2001) The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia* 44:1148–1154
85. Bianchi C, Penno G, Malloggi L et al (2008) Non-traditional markers of atherosclerosis potentiate the risk of coronary heart disease in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:31–38
86. Despres JP, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881–887
87. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Heine RJ, Holman RR, Sherwin R, Zinman B (2006) Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 29(8):1963–1972
88. Wilson PWF, Grundy SM (2003) The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: part I. *Circulation* 108:1422–1425
89. Poobalan A, Aucott L, Smith WC et al (2004) Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term lipid outcomes – a systematic review. *Obes Rev* 5:43–50
90. Leon AS, Sanchez OA (2001) Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc* 33:S502–S515
91. Byberg L, Zethelius B, McKeigue PM et al (2001) Changes in physical activity are associated with changes in metabolic cardiovascular risk factors. *Diabetologia* 44:2134–2139
92. Wilund KR, Colvin PL, Phares D et al (2002) The effect of endurance exercise training on plasma lipoprotein AI and lipoprotein AI: AII concentrations in sedentary adults. *Metabolism* 51:1053–60
93. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD et al (2002) Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 347:1483–1492
94. Moreau KL, Degarmo R, Langley J et al (2001) Increasing daily walking lowers blood pressure in postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc* 33:1825–1831
95. Arciero PJ, Vukovich MD, Holloszy JO et al (1999) Comparison of short-term diet and exercise on insulin action in individuals with abnormal glucose tolerance. *J Appl Physiol* 86:1930–1935
96. DiPietro L, Seeman TE, Stachenfeld NS et al (1998) Moderate-intensity aerobic training improves glucose tolerance in aging independent of abdominal adiposity. *J Am Geriatr Soc* 46:875–9
97. Irwin M, Mayer-Davis E, Addy C et al (2000) Moderate intensity physical activity and fasting insulin levels in women: The Cross Cultural Activity Participation Study. *Diabetes Care* 23:449–454
98. Mayer-Davis E, D'Agostino R, Karter A et al (1998) Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA* 279:669–674
99. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ et al (2001) Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 345:790–797
100. Hu FB, Leitzmann MF, Stampfer MJ et al (2001) Physical activity and television watching in relation to risk for type 2 diabetes mellitus in men. *Arch Intern Med* 161:1542–1548
101. Katzmarzyk PT, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, Rankinen T, Bouchard C (2003) Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc* 35:1703–1709
102. Pan XR, Li GW, Hu YH et al (1997) Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: the Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 20:537–544
103. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R et al (2005) Diabetes Prevention Program Research Group. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 142:611–619
104. Anderssen SA, Hjermann I, Urdal P, Torjesen PA, Holme I (1996) Improved carbohydrate metabolism after physical training and dietary intervention in individuals with the “atherothrombotic syndrome”. Oslo Diet and Exercise Study (ODES). A randomized trial. *J Intern Med* 240:203–209
105. Anderssen SA, Carroll S, Urdal P, Holme I (2007) Combined diet and exercise intervention reverses the metabolic syndrome in middle-aged males: results from the Oslo Diet and Exercise Study. *Scand J Med Sci Sports* 2007 (Epub ahead of print)
106. Lofgren IE, Herron KL, West KL, Zern TL, Brownbill RA, Ilich JZ, Koo SI, Fernandez ML (2005) Weight loss favorably modifies anthropometrics and reverses the metabolic syndrome in premenopausal women. *J Am Coll Nutr* 24:486–493
107. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoschoou C, Skoumas J, Tousoulis D, Toutouza M, Toutouzas P, Stefanadis C (2004) Impact of lifestyle habits on the prevalence of the metabolic syndrome among Greek adults from the ATTICA study. *Am Heart J* 147:106–112
108. Liese AD, Schulz M, Moore CG, Mayer-Davis EJ (2004) Dietary patterns, insulin sensitivity and adiposity in the multi-ethnic Insulin Resistance Atherosclerosis Study population. *Br J Nutr* 92:973–984
109. Halkjaer J, Sorensen TI, Tjonneland A, Togo P, Holst C, Heitmann BL (2004) Food and drinking patterns as predictors of 6-year BMI-adjusted changes in waist circumference. *Br J Nutr* 92:735–748
110. Koh-Banerjee P, Chu NF, Spiegelman D, Rosner B, Colditz G, Willett W, Rimm E (2003) Prospective study of the association of changes in dietary intake, physical activity, alcohol consumption, and smoking with 9-y gain in waist circumference among 16 587 US men. *Am J Clin Nutr* 78:719–727
111. Lopes HF, Martin KL, Nashar K, Morrow JD, Goodfriend TL, Egan BM (2003) DASH diet lowers blood pressure and lipid-induced oxidative stress in obesity. *Hypertension* 41:422–430
112. He FJ, Markandu ND, MacGregor GA (2005) Modest salt reduction lowers blood pressure in isolated systolic hypertension and combined hypertension. *Hypertension* 46:66–70
113. Hajjar IM, Grim CE, George V, Kotchen TA (2001) Impact of diet on blood pressure and age-related changes in blood pressure in the US population: analysis of NHANES III. *Arch Intern Med* 161:589–593

114. Zilkens RR, Burke V, Hodgson JM, Barden A, Beilin LJ, Puddey IB (2005) Red wine and beer elevate blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 45:874–879
115. McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF (2004) Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care* 27:538–546
116. Liese AD, Schulz M, Fang F, Wolever TM, D'Agostino RB Jr, Sparks KC, Mayer-Davis EJ (2005) Dietary glycemic index and glycemic load, carbohydrate and fiber intake, and measures of insulin sensitivity, secretion, and adiposity in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 28:2832–2838
117. Choi HK, Willett WC, Stampfer MJ, Rimm E, Hu FB (2005) Dairy consumption and risk of type 2 diabetes mellitus in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 165:997–1003
118. Stern L, Iqbal N, Seshadri P, Chicano KL, Daily DA, McGoroy J, Williams M, Gracely EJ, Samaha FF (2004) The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med* 140:778–785
119. Azadbakht L, Mirmiran P, Esmailzadeh A, Azizi T, Azizi F (2005) Beneficial effects of a Dietary Approaches to Stop Hypertension eating plan on features of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 28:2823–2831
120. Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, Holmes MD, Hu FB, Hankinson SE, Willett WC (2001) Dietary glycemic load assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma high-density-lipoprotein cholesterol and fasting plasma triacylglycerols in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 73:560–566
121. Finnegan YE, Miniham AM, Leigh-Firbank EC, Kew S, Meijer GW, Muggli R, Calder PC, Williams CM (2003) Plant- and marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids have differential effects on fasting and postprandial blood lipid concentrations and on the susceptibility of LDL to oxidative modification in moderately hyperlipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 77:783–795
122. Katzmarzyk PT, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, Rankinen T, Bouchard C (2003) Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc* 35:1703–1709
123. Barengo NC, Hu G, Lakka TA, Pekkarinen H, Nissinen A, Tuomilehto J (2004) Low physical activity as a predictor for total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women in Finland. *Eur Heart J* 25:2204–2211
124. Laaksonen DE, Lakka HM, Salonen JT, Niskanen LK, Rauramaa R, Lakka TA (2002) Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25:1612–1618
125. Mann JI (2006) Nutrition recommendations for the treatment and prevention of type 2 diabetes and the metabolic syndrome: an evidenced-based review. *Nutr Rev* 64:422–427
126. Szapary PO, Hark LA, Burke FM (2002) The metabolic syndrome: a new focus for lifestyle modification. *Patient Care* 36:75–88
127. Bravata DM, Sanders L, Huang J et al (2003) Efficacy and safety of low carbohydrate diets: a systemic review. *JAMA* 289:1837–1850
128. Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P et al (2003) A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* 348:2074–81
129. Brehm BJ, Seeley RJ, Daniels SR et al (2003) A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie restricted low-fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1617–1623
130. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO et al (2003) A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* 348:2082–2090
131. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA (2004) Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 23:447–456
132. Howard BV (2002) Dietary fat as a risk factor for type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 967:324–328
133. Ylonen K, Saloranta C, Kronberg-Kippila C, Groop L, Aro A, Virtanen SM, Botnia Dietary Study (2003) Associations of dietary fiber with glucose metabolism in nondiabetic relatives of subjects with type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *Diabetes Care* 26:1979–1985
134. Schulze MB, Liu S, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Hu FB (2004) Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 80:348–356
135. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E et al (1997) A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 336:1117–1124
136. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM et al (2001) Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med* 344:3–10
137. Appel LJ, Champagne CM, Harsha DW et al (2003) Writing Group of the PREMIER Collaborative Research Group. Effects of comprehensive lifestyle modification on blood pressure control: main results of the PREMIER clinical trial. *JAMA* 289:2083–2093
138. Freiberg MS, Cabral HJ, Heeren TC, Vasan RS, Curtis Ellison R (2004) Third national health and nutrition examination survey. Alcohol consumption and the prevalence of the metabolic syndrome in the US.: a cross-sectional analysis of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 27:2954–2959
139. Arif AA, Rohrer JE (2005) Patterns of alcohol drinking and its association with obesity: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *BMC Public Health* 5:126
140. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D (2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 348:2599–2608
141. Panagiotakos DB, Polychronopoulos E (2005) The role of Mediterranean diet in the epidemiology of metabolic syndrome; converting epidemiology to clinical practice. *Lipids Health Dis* 4:7
142. Keller C, Trevino RP (2001) Effects of two frequencies of walking on cardiovascular risk factor reduction in Mexican American women. *Res Nurs Health* 24:390–401
143. Thompson PD, Buchner D, Pina IL et al (2003) Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association council on clinical cardiology (subcommittee on exercise, rehabilitation, and prevention) and the council on nutrition, physical activity, and metabolism (subcommittee on physical activity). *Circulation* 107:3109–3116
144. Ross R, Dagnone D, Jones PJ et al (2000) Reduction in obesity and related co-morbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. *Ann Intern Med* 133:92–103
145. Hu G, Tuomilehto J, Borodulin K, Jousilahti P (2007) The joint associations of occupational, commuting, and leisure-time physical activity, and the Framingham risk score on the 10-year risk of coronary heart disease. *Eur Heart J* 28:492–498
146. Nilsson P, Lundgren H, Soderstrom M, Fagerstrom KO, Nilsson-Ehle P (1996) Effects of smoking cessation on insulin and cardiovascular risk factors—a controlled study of 4 months' duration. *J Intern Med* 240:189–194

Primary Prevention of Cardiovascular Disease in People With Dysglycemia

CRISTINA BIANCHI, MD
ROBERTO MICCOLI, MD, PHD

GIUSEPPE PENNO, MD
STEFANO DEL PRATO, MD

Cardiovascular disease accounts for a great majority of deaths in patients with type 2 diabetes. According to the World Health Organization, the prevalence of cardiovascular disease in diabetic patients ranges from 26 to 36%. Fatality rate after myocardial infarction is greater in diabetic patients, and overall prognosis after coronary heart disease is worse. Based on these observations, it has been proposed that diabetes should be considered as a coronary heart disease risk equivalent. If that is the case, prevention of diabetes and early intervention should be pursued. This view is supported by the notion that cardiovascular risk is already increased in people with impaired glucose tolerance. Moreover, higher-than-optimum blood glucose is a major cause of cardiovascular mortality in most world regions of the world. Whether dysglycemia is a marker for a more complex metabolic condition or may directly contribute to excess cardiovascular risk is still a matter of debate. However, experimental work has shown how increased glucose level can trigger multiple mechanisms of susceptibility to atherosclerosis, and diabetes prevention trials have indicated that along with reduction of the rate of conversion toward diabetes, significant improvement in cardiovascular risk factors occurs. Moreover, in the STOP-NIDDM trial, targeting postprandial glucose was associated with reduction in new cases of hypertension, myocardial infarction, and any cardiovascular events. In conclusion, dysglycemia should be included in the list of established cardiovascular risk factors and early treatment introduced in the attempt to improve cardiovascular morbidity and mortality.

Diabetes Care 31 (Suppl. 2):S208–S214, 2008

Diabetes is associated with great risk of morbidity and mortality, with cardiovascular disease (CVD) accounting for up to two-thirds of all deaths in the diabetic population (1). A number of longitudinal epidemiological studies have shown that the risk of CVD mortality in diabetic patients is more than double compared with age-matched people (2,3). Among type 2 diabetic patients, even after correction for other known cardiovascular risk factors, the incidence of myocardial infarction or stroke is increased two- to threefold and the risk of death is increased twofold (4), suggesting that some feature of diabetes must confer

such an excessive propensity toward CVD.

Hyperglycemia is the diagnostic feature for diabetes, the target for anti-diabetic therapy, and, together with A1C, the marker of glycemic control. Maintaining good glycemic control has been associated with marked reduction in the risk of developing retinopathy, nephropathy, and neuropathy in both type 1 (5) and type 2 (6,7) diabetic patients. On the other hand, intensive diabetes therapy has long-term beneficial effects on the risk of CVD in both type 1 and type 2 diabetes (8).

From an epidemiological point of

view, there is evidence that the risk of cardiovascular mortality increases with the increase of plasma glucose concentrations and A1C levels (9,10). However, while the effect of plasma glucose levels appears to be preponderant in determining microvascular risk, this does not seem to be the case for macrovascular complications.

Analysis of the U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) data clearly indicates that for the same degree of A1C, particularly in its low range, the incidence of myocardial infarction is much greater than that of retinopathy (11). This apparent paradox can only be resolved by acknowledging the multifactorial nature of cardiovascular risk in type 2 diabetic patients. Many of these factors have emerged in the UKPDS as well. Thus, in a ranking analysis, A1C turned out to be the third most important factor in determining cardiovascular risk in type 2 diabetic patients (6).

This approach, however, underscores the intimate relationship existing among cardiovascular risk factors in diabetes. In support for a catalytic effect of diabetic hyperglycemia are the classic results of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) (12). In that study, cardiovascular mortality was shown to increase with the number of coexisting cardiovascular risk factors (hypercholesterolemia, hypertension, smoking). Notably, the same occurred in the diabetic population, though the risk was magnified by concomitant hyperglycemia. More recently, re-analysis of the UKPDS results have clearly documented a powerful interaction between glycemic and blood pressure control in increasing risk for all-cause mortality, myocardial infarction, and stroke (13).

An even more direct association between glycemic control and severity of the cardiovascular risk profile can be postulated. In a recent analysis performed in our institution, the prevalence of metabolic syndrome (based on the Adult Treatment Panel III criteria) increased with the increase of A1C (Fig. 1), suggesting that improvement of glycemic control may be associated with beneficial influence of many other CVD risk factors (14). This association seems to exceed the diabetic range. In the past few years, we have

From the Department of Endocrinology and Metabolism, Section of Diabetes and Metabolic Diseases, University of Pisa, Pisa, Italy.

Address correspondence and reprint requests to Stefano Del Prato, MD, Department of Endocrinology and Metabolism, Section of Diabetes and Metabolic Diseases, Ospedale Cisanello, Via Paradisa, 2, 56124 Pisa, Italy. E-mail: delprato@immmr.med.unipi.it.

S.D.P. has served on an advisory panel for Novartis Pharmaceuticals, Merck & Co., Roche Pharmaceuticals, Roche Diagnostics Corporation, Pfizer Inc., Eli Lilly and Co., Amylin Pharmaceuticals, Inc., and Mannkind Corporation; has received research support from Merck & Co., Pfizer Inc., Eli Lilly and Co., and sanofi-aventis; and is a member of the speaker bureau for GlaxoSmithKline, sanofi-aventis, and Novartis Pharmaceuticals. C.B., R.M., and G.P. declare no relevant conflict of interest.

This article is based on a presentation at the 1st World Congress of Controversies in Diabetes, Obesity and Hypertension (CODHy). The Congress and the publication of this article were made possible by unrestricted educational grants from MSD, Roche, sanofi-aventis, Novo Nordisk, Medtronic, LifeScan, World Wide, Eli Lilly, Keryx, Abbott, Novartis, Pfizer, Genex Biotechnology, Schering, and Johnson & Johnson.

Abbreviations: CVD, cardiovascular disease; IFG, impaired fasting glucose; IGT, impaired glucose tolerance; UKPDS, U.K. Prospective Diabetes Study.

DOI: 10.2337/dc08-s256

© 2008 by the American Diabetes Association.

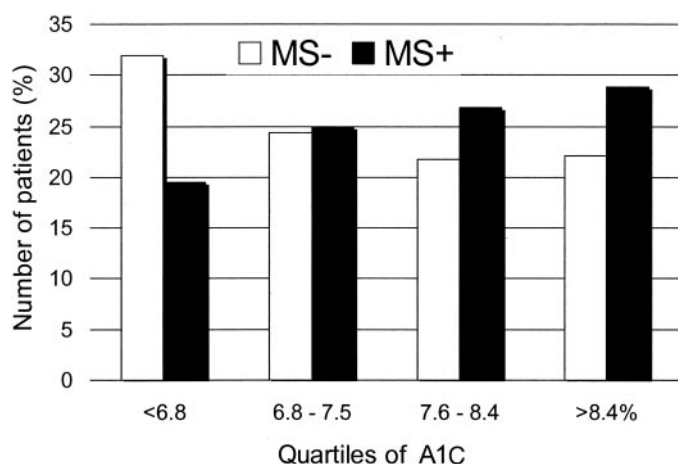


Figure 1—Prevalence of metabolic syndrome (MS) in type 2 diabetes, according to glycemic control.

recruited 1,300 individuals in an Italian multicenter study designed to identify subjects at risk of developing type 2 diabetes: Genetic and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Evolution (GENFIEV). When this population was analyzed in terms of prevalence of the metabolic syndrome, a trend was found for an increase in such prevalence as a function of glucose tolerance. A similar relationship between glucose tolerance and cardiovascular events has been reported (15–17). In the Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe (DECODE), the risk for CVD, coronary artery disease, and stroke increased, moving from a condition of impaired fasting glucose (IFG) to impaired glucose tolerance (IGT) to overt diabetes (18). These observations support the view that glucose is a continuous risk factor for cardiovascular mortality (19).

HYPERGLYCEMIA AS A CARDIOVASCULAR RISK FACTOR IN THE NONDIABETIC SUBJECT

The first indication that hyperglycemia may represent a cardiovascular risk factor dates back to 1965 when the Bedford Study (20) and the Tecumseh Study (21) were published. These cross-sectional studies indicated that increased blood glucose levels were associated with greater cardiovascular mortality. However, it was only 15 years later that the first systematic analysis of this relationship appeared. The International Collaborative Group reviewed findings from 11 different studies with an observation period of 4–15 years (22). However, this analysis did not yield univocal results,

and it was not possible to support a clear-cut association between asymptomatic hyperglycemia and CVD (22). A close association between fasting plasma glucose or A1C levels and CVD was found during a 10-year follow-up in the Uusitupa study, which included 133 newly diagnosed diabetic subjects (22).

Coutinho et al. (17) carried out a meta-analysis of 20 studies for a total of 95,783 nondiabetic subjects who had, during a mean follow-up of 12.4 years, 3,707 cardiovascular events. In this meta-analysis, an exponential relationship between the risk of cardiovascular events and both fasting and postload plasma glucose levels was found. Such a relationship extended below diagnostic blood glucose levels for IFG or IGT. The Cardiovascular Health Study (23) assessed cardiovascular risk factors in people aged ≥ 65 years and showed that CVD was related to both fasting and postchallenge glucose. Even if much research has been performed in Western populations, recent evidence demonstrated similarly increased risks in Asian populations. Analysis of cohorts from the Asia Pacific region indicates a positive continuous association between usual blood glucose and cardiovascular risk. This association holds for glucose levels as low as 4.9 mmol/l, i.e., below diagnostic fasting plasma glucose for diabetes and IGT (24). Evidence has been recently published to support that higher-than-optimum blood glucose is a major cause of cardiovascular mortality in most world regions (25). While diabetes was associated with a total of 959,000 deaths, 1,490,000 deaths for ischemic heart disease and 709,000 from stroke were attributable to higher-than-optimum blood

glucose, accounting for 21 and 13% of all deaths from those conditions.

An even greater cardiovascular risk is likely to be associated with excessive postload glucose levels (18,26–29). The DECODE study (26) evaluated data from 13 epidemiologic studies and found that the mortality risk of IFG subjects was 1.2, while it was 1.5 in IGT individuals. Subsequent analysis of the DECODE database explored the association between categories of glucose tolerance and ischemic heart disease, CVD, and mortality for all causes (18). Upon adjustment for BMI, blood pressure, total cholesterol, and smoking habit, relative mortality risk did not increase as a function of fasting plasma glucose levels, while it remained highly significant for postload glucose values. Moreover, when excess mortality was considered, no association was found with isolated fasting hyperglycemia, whereas IGT and IFG+IGT accounted for 44 and 14% of the excess mortality, respectively. Similarly, in the Funagata Diabetes Study (27), cardiovascular mortality in IGT was very close to that of subjects with diabetes and much greater than that in IFG individuals. Among 3,092 adults aged 30–74 years (28), an increased relative risk of all-cause mortality of 1.6 (95% CI 1.0–2.6) was found in subjects with newly diagnosed diabetes based on isolated postchallenge hyperglycemia (glucose ≥ 11.1 mmol/l), whereas the relative risk of death in those with known diabetes was 2.1 (95% CI 1.4–3.2). Mortality was also increased in IGT subjects who had a relative risk of 1.3 (95% CI 1.0–1.6). In the Hoorn Study (29), the relative risk of cardiovascular mortality started to be significant from a fasting glucose level of 6.1 mmol/l onward. Both postloading glucose and A1C showed a linear correlation to cardiovascular risk, even in the nondiabetic range. However, the authors of this study recently showed that the association between IFG and the risk of CVD mortality depends on the conversion to diabetes during the follow-up (30). In fact, subjects who converted from IFG to diabetes had a more than twofold risk of CVD mortality (IFG 6.1: 2.47 [1.17–5.19]; IFG 5.6: 2.14 [1.12–4.10]) than subjects with normal fasting glucose, whereas IFG subjects who did not develop diabetes did not have significantly higher CVD mortality risks (IFG 6.1: 1.50 [0.72–3.15]; IFG 5.6: 1.15 [0.69–1.93]).

A1C level provides an integrated measure of glycemic control, including

both fasting and postprandial glucose levels. A meta-analysis of observational studies has documented increased risk of CVD associated with higher levels of A1C in diabetic patients (31).

Unfortunately, few longitudinal studies are available in nondiabetic subjects. In a study carried out in the U.K. including ~5,000 individuals with A1C >5.0%, a direct correlation was found with total and coronary heart disease mortality (15), with a 41% increase in the relative risk per percent point increase in A1C. Similar results have been produced in a Dutch study including 2,363 nondiabetic individuals, in whom the mortality risk increased by 51% per 1.4% point of A1C (29). In the Rancho Bernardo Study (32), an association between A1C and cardiovascular mortality was found among women but not among men. The association between A1C levels and peripheral arterial disease has been recently analyzed in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2002 (33). The study confirmed that A1C was a significant predictor of peripheral arterial disease, an association that persisted even within the normal range and after multivariable adjustment.

Whether hyperglycemia is the culprit of such an elevated cardiovascular risk remains to be elucidated, since it may be a simple but very useful marker for a condition characterized by concomitance of multiple cardiovascular risk factors. Participants in the San Antonio Heart Study who did not have diabetes at baseline but developed type 2 diabetes during an 8-year follow-up had higher total and LDL cholesterol, triglycerides, BMI, and blood pressure measurements and lower HDL cholesterol than subjects who did not develop type 2 diabetes (34). Based on these observations, the “ticking clock” hypothesis was formulated, which postulates that “the clock for coronary heart disease starts ticking before the onset of clinical diabetes” (34). The findings of the Nurses’ Health Study (35) provide support to this hypothesis, showing that the risk for CVD occur long before the onset of overt hyperglycemia. In this large prospective cohort study, an elevated risk of myocardial infarction and stroke was found before clinical diagnosis of type 2 diabetes, compared with women who remained nondiabetic throughout the study. Increased risk persisted in obese and nonobese women as well as in those with or without a family history of diabetes (35). Cardiovascular risk was already

increased 15 years before diagnosis of diabetes and increased further upon clinical diagnosis of the disease. In that study, women converting to type 2 diabetes had a more atherogenic risk profile (e.g., higher BMI values and greater prevalence of hypertension and hypercholesterolemia) than individuals retaining normal glucose tolerance during the study (35).

In the Botnia Study, ~50% of the subjects classified as IFG and/or IGT also met the diagnosis of metabolic syndrome, and these individuals had greater risk for both coronary heart disease and stroke (36). This finding is in agreement with the results of a pooled analysis of several prospective studies published from 1988 to 2004 indicating that the relative risk for CVD in individuals with metabolic syndrome, as defined by National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, was 1.65 (95% CI 1.38–1.99) and that the relative risks for all-cause mortality and diabetes were 1.27 (0.90–1.78) and 2.99 (1.96–4.57), respectively (37).

MECHANISMS OF VASCULAR DAMAGE OF HYPERGLYCEMIA

Pre-diabetic dysglycemia acts in concert with other cardiovascular risk factors within the picture of the metabolic syndrome. Subjects with dysglycemia often have insulin resistance and hyperinsulinemia, elevated blood pressure, high total and VLDL triglycerides, low HDL cholesterol, small and dense LDL, central adiposity, elevated levels of plasminogen activator inhibitor 1, and low-grade inflammation (38). In spite of all this, experimental evidence supports a direct effect of mild alteration of glucose homeostasis on the atherogenic process. Early alterations of glucose homeostasis is often heralded by postprandial hyperglycemia. Higher and persistent elevation of postprandial plasma glucose levels contribute significantly to overall glycemic exposure of body tissues (39). Moreover, excessive and repeated glucose excursions lead to increased glycemic variability. Overall, glycemic exposure and glycemic variability can both contribute to favor development of atherosclerosis. The arterial wall is indeed a critical target for such glycemic insult. Protein glycosylation causes cross-linking of collagen and other extracellular matrix proteins in the arterial wall, increasing susceptibility to atherosclerosis. Glycosylation of LDL results in more athero-

genic particles, macrophage activation, and foam cell formation. A more direct action is exerted on endothelial cells leading to endothelial dysfunction, an early manifestation of atherosclerosis, and a strong predictor for CVD (40).

In type 2 diabetes, glucose fluctuations during postprandial periods and, more generally, during swings exhibited a more specific triggering effect on oxidative stress than chronic hyperglycemia (41). Several *in vitro* studies have demonstrated increased expression of markers of oxidative stress in cells exposed to fluctuating glucose concentrations (42). Hyperglycemia in non-insulin-dependent tissues such as endothelium results in overproduction of superoxide and free radicals by the mitochondrial electron transport chain. Free radicals may mediate some of the effects associated with hyperglycemia: vasoconstriction, activation of coagulation, and increased adhesion molecule expression. As described by Brownlee (43), NADPH inhibition by superoxide slows down the glycolytic flux and leads to accumulation of glycolytic precursors, which in turn allow activation of pathways that normally account for a small proportion of intracellular glucose metabolism: the polyol pathway, the hexosamine pathway, protein kinase C activation, and the advanced glycation end product formation. Chronic and acute hyperglycemia alter the activity of protein kinase C (44), a key enzyme in signal transduction. Its activation increases secretion of endothelin, type IV collagen, and fibronectin; enhances expression of adhesion molecules in endothelial cells; and activates macrophage migration processes.

Postprandial hyperglycemia and glycemic instability are also associated with a proinflammatory state, as indicated by generation of advanced glycation end products, increased C-reactive protein, and tumor necrosis factor- α . Acute hyperglycemia also activates carbonyl stress, leading to formation of highly reactive species such as 3-deoxyglucosone and methylglyoxal (45).

In summary, epidemiological data linking dysglycemia with cardiovascular risk are supported by experimental findings illustrating the mechanisms through which even mild alterations in glucose homeostasis may favor development and progression of the atherosclerotic lesion.

CARDIOVASCULAR RISK REDUCTION IN DYSGLYCEMIC SUBJECTS

Final evidence for glucose as a cardiovascular risk factor can be based only on intervention studies. The heated discussion about the 15% reduction of myocardial infarction in the UKPDS has not yet settled (11). Still, epidemiologic analysis of those data has indicated a 14% risk reduction for myocardial infarction for each 1% reduction in A1C (11). These results have received further support from recent work in type 1 diabetic patients. In the follow-up report of the Diabetes Control and Complications Trial, reduced carotid intima-media thickness was found in intensively treated patients compared with those on conventional insulin therapy (46). Reduced progression of atherosclerosis was then confirmed by a more recent publication reporting a 42% reduction of the risk of any predefined CVD outcome ($P = 0.02$) and 57% reduction of the risk of the first occurrence of nonfatal myocardial infarction, stroke, or death from CVD ($P = 0.02$) (47).

If strict glycemic control is recommended to reduce risk for micro- and macrovascular complications, a large number of individuals still present signs of cardiovascular involvement at the time of diabetes diagnosis. Therefore, effort should be made to reduce cardiovascular risk at the time when dysglycemia develops rather than when hyperglycemia develops. A few years ago, the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (48) identified diabetes as a coronary heart disease risk equivalent. If that is the case, prevention of diabetes should be pursued with the same effort paid to reduce other known cardiovascular risk factors. Direct evidence for such an opportunity is still scanty, but all diabetes prevention trials indicate a positive effect on cardiovascular risk profile.

In the Finnish Diabetes Prevention Study (49), lifestyle modification in IGT patients reduced conversion to diabetes by 58%. Along with lower risk of diabetes, almost all cardiovascular risk factors were significantly reduced. At the end of the 3.2-year follow up, diastolic and systolic blood pressure, serum triglycerides, and plasma insulin levels were all much lower in the intervention group than in control individuals (49). The results of the Diabetes Prevention Program (50)

provide further evidence of the potential benefit of lifestyle changes beyond diabetes prevention. Hypertension was present in 30% of participants at study entry and then increased in the placebo and metformin groups, although it significantly decreased with intensive lifestyle intervention. Triglyceride levels fell in all treatment groups, but fell significantly more with intensive lifestyle intervention. Total cholesterol and LDL cholesterol levels were similar among treatment groups. Intensive lifestyle intervention significantly increased the HDL cholesterol level and reduced the cumulative incidence of the proatherogenic LDL phenotype B. After a 3-year follow-up, the use of pharmacologic therapy to achieve established goals in the intensive lifestyle group was 27–28% less for hypertension and 25% less for hyperlipidemia compared with placebo and metformin groups. Lifestyle intervention also reduced levels of nontraditional cardiovascular risk factors, such as C-reactive protein, relative to both placebo and to a lesser degree to metformin (51). Finally, incidence of the metabolic syndrome was reduced by 41% in the lifestyle group ($P < 0.001$) and by 17% in the metformin group ($P < 0.03$) compared with placebo (52).

Though lifestyle modification appears to be highly effective, use of medications for prevention of or early treatment of dysglycemia also results in the improvement of cardiovascular risk factors, as indicated by the use of metformin in the Diabetes Prevention Program. Anti-obesity drugs such as orlistat, an inhibitor of pancreatic and gastrointestinal lipases, have been shown to reduce conversion toward diabetes in obese individuals irrespective of their glucose tolerance. In the XENDOS (Xenical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects) trial ($n = 3,305$ obese nondiabetic individuals), orlistat, combined with lifestyle changes, reduced the incidence of type 2 diabetes compared with placebo (plus lifestyle changes) by 37.3% ($P = 0.0032$) (54). In those individuals, a 7-kg body weight reduction was associated with lower levels of LDL cholesterol and greater reduction blood pressure values as compared with control subjects (54). Rimonabant, a cannabinoid receptor (CB1) antagonist, has generated even greater expectation. The RIO (Rimonabant in Obesity) studies have shown that rimonabant, at the dose of 20 mg/day, causes >5% weight loss in 30–40% of patients and >10% in 10–20% of them

compared with diet alone over a 2-year period, as well as an extra 8–10% increase in HDL cholesterol and a 10–30% reduction in triglycerides. In patients with type 2 diabetes, the treatment results in improvement in insulin resistance, glycemic control, adipokines, and inflammatory proteins (54–56).

A 62% reduction in diabetes and greater conversion to normal glucose tolerance has been documented in the DREAM (Diabetes Reduction Assessment With Ramipril and Rosiglitazone Medication) study in IGT subjects treated with 8 mg rosiglitazone compared with the control group. Active treatment was also associated with modest though highly significant reduction in diastolic and systolic blood pressure (57). No effect was found in terms of cardiovascular events with the exception of increased risk for heart failure in people on rosiglitazone. However, none of the prevention trials so far discussed was powered nor designed to detect an effect on cardiovascular events. Still, supportive observation is available. The Malmö Prevention Study was carried out 30 years ago (58). In that study, 147 pre-diabetic individuals were randomly treated with diet and placebo, diet and tolbutamide, or no therapy at all. As expected, diet was effective in reducing conversion to diabetes when compared with no treatment. However, even more effective was the concomitant use of tolbutamide, with not a single case of diabetes observed over a 10-year follow-up. Fifteen years after the publication of those results, data of a longer follow-up were reported showing significant reduction in all-cause mortality and ischemic heart disease in individuals initially treated with tolbutamide (60). The study is questionable because of small sample size. The NAVIGATOR study will test a similar hypothesis in >9,000 dysglycemic individuals by targeting postprandial glucose with nateglinide (61).

The results of the Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (STOP-NIDDM) (62) seem to confirm the role for specific treatment of postprandial glucose levels, at least in individuals who still have a moderate increase in fasting plasma glucose concentration. In IGT patients, treatment with acarbose, an intestinal α -glucosidase inhibitor, not only reduced conversion to type 2 diabetes by 30%, but was also associated with reduction of the risk of any cardiovascular event by 49%, of an acute myocardial infarction by 91%, and of developing hy-

pertension by 34%. Still lacking is the evidence that strict maintenance of normal fasting plasma glucose levels also may reduce cardiovascular risk. The results of the ORIGIN study may provide an initial answer to the question (63).

CONCLUSIONS — In summary, epidemiologic data support the hypothesis of a direct and independent relationship between blood glucose levels and CVD. The lack of a clear-cut threshold value in diabetic patients and the persistence of the relationship in the nondiabetic population suggest that blood glucose is a continuous variable, similarly to other CVD risk factors. Prevention or delay in onset of diabetes is of utmost importance because chronic hyperglycemia is associated with CVD, and the risk starts to increase long before the onset of clinical diabetes.

Moreover, dysglycemia is often associated with other risk cardiovascular factors to result in the metabolic syndrome, a condition loaded with high propensity to atherosclerosis. Reducing the burden of CVD will then require identification of initial alteration of glucose homeostasis, as well as careful search of any associated CV risk factor. Lifestyle modification has been shown to be quite effective in preventing conversion of IGT patients toward overt diabetes, also resulting in effective improvement of many cardiovascular risk factors. Pharmacological intervention may provide benefit as well, although further studies are needed to characterize the benefits of these therapeutic strategies to reduce cardiovascular risk. In the meantime, clinicians should evaluate and treat all cardiovascular risk factors (64), including dysglycemia.

References

- Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala L, Laakso M: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and non-diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229–234, 1998
- Kannel WB, McGee DL: Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham Study. *JAMA* 241:2035–2038, 1979
- Pan WH, Cedres LB, Liu K, Dyer A, Schoenberger JA, Shekelle RB, Stamler R, Smith D, Collette P, Stamler J: Relationship of clinical diabetes and asymptomatic hyperglycemia to risk of coronary heart disease mortality in men and women. *Am J Epidemiol* 123:504–516, 1986
- Almadal T, Scharling H, Jensen JS, Vestergaard H: The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death. *Arch Intern Med* 12:1422–1426, 2004
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977–986, 1993
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837–853, 1998
- Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 28:103–117, 1995
- Stettler C, Allemann S, Juni P, Cull CA, Holman RR, Egger M, Krahenbuhl S, Diem P: Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J* 152:27–38, 2006
- Laakso M: Glycemic control and the risk for coronary heart disease in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Finnish Studies. *Ann Intern Med* 124:127–130, 1996
- Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP: Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. *Diabetes Care* 21:1167–1173, 1998
- Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley Se, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR: Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321:405–412, 2000
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D, for the Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16:434–444, 1993
- Stratton IM, Cull CA, Adler AI, Matthews DR, Neil HA, Holman RR: Additive effects of glycaemia and blood pressure exposure on risk of complications in type 2 diabetes: a prospective observational study (UKPDS 75). *Diabetologia* 49:1761–1769, 2006
- Bianchi C, Penno G, Malloggi L, Barontini R, Corfini M, Giovannitti MG, Di Cianni G, Del Prato S, Miccoli R: Non-traditional markers of atherosclerosis potentiate the risk of coronary heart disease in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. In press
- Khaw KT, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, Day N: Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 322:15–18, 2001
- DECODE Study Group, European Diabetes Epidemiology Group: Is the current definition for diabetes relevant to mortality risk from all causes and cardiovascular and noncardiovascular diseases? *Diabetes Care* 26:688–696, 2003
- Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S: The relationship between glucose and incident cardiovascular events. a meta-regression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 22:233–240, 1999
- DECODE Study Group: Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 161:397–405, 2001
- Gerstein HC: Is glucose a continuous risk factor for cardiovascular mortality? *Diabetes Care* 22:659–660, 1999
- Jarrett RJ, McCartney P, Keen H: The Bedford survey: ten year mortality rates in newly diagnosed diabetics, borderline diabetics and normoglycaemic controls and risk indices for coronary heart disease in borderline diabetics. *Diabetologia* 22:79–84, 1982
- Butler WJ, Ostrander LD Jr, Carman WJ, Lamphiear DE: Mortality from coronary heart disease in the Tecumseh study: long term effect of diabetes mellitus, glucose tolerance and other risk factors. *Am J Epidemiol* 121:541–547, 1985
- Uusitupa MIJ, Niskanen LK, Voutilainen E, Pyorala M, Forhan A, Eschewege E: Ten year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoproteins composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 36:1175, 1993
- Barzilay JI, Spiekerman CF, Wahl PW, Kuller LH, Cushman M, Furberg CD, Dobs A, Polak JF, Savage PJ: Cardiovascular disease in older adults with glucose disorders: comparison of American Diabetes Association criteria for diabetes mellitus and WHO criteria. *Lancet* 354:622–625, 1999
- Asia Pacific Cohort Studies Collaboration: Blood glucose and risk of cardiovascular disease in the Asia Pacific region. *Diabetes Care* 27:2836–2842, 2004
- Danaei G, Lawes CM, Vander Hoorn S, Murray CJ, Ezzati M: Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment. *Lancet* 368:

- 1651–1659, 2006
26. DECODE Study Group, on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group: Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 354: 617–621, 1999
27. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A: Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose: the Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 22:920–924, 1999
28. Saydah SH, Miret M, Sung J, Varas C, Gause D, Brancati FL: Post-challenge hyperglycaemia and mortality in a national sample of U.S. adults. *Diabetes Care* 24: 1397–1402, 2001
29. de Vegt F, Dekker JM, Ruhe HG, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, Heine RJ: Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia* 42:926–931, 1999
30. Rijkkelijkhuizen JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD, Dekker JM: High risk of cardiovascular mortality in individuals with impaired fasting glucose is explained by conversion to diabetes: the Hoorn study. *Diabetes Care* 30:332–336, 2007
31. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH: Meta-analysis: glycosylated haemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 141:421–431, 2004
32. Park S, Barrett-Connor E, Wingard DL, Shan J, Edelstein S: GHb is a better predictor of cardiovascular disease than fasting or postchallenge plasma glucose in women without diabetes: the Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 19:450–456, 1996
33. Muntiner P, DeSalvo KB, Wildman RP, Chen J, Reynolds K, Fonseca V: Relationship between HbA1c level and peripheral arterial disease. *Diabetes Care* 28:1981–1987, 2005
34. Haffner SM, Stern MR, Hazuda HE, Mitchell BD, Patterson JK: Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals: does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA* 263:2893–2898, 1990
35. Hu FB, Stampfer MJ, Haffner SM, Solomon CG, Willett WC, Manson JE: Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25:1129–1134, 2002
36. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683–689, 2001
37. Ford ES: Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* 28:1769–1778, 2005
38. De Fronzo R, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173–194, 1991
39. Del Prato S: In search of normoglycaemia in diabetes: controlling postprandial glucose. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 (Suppl. 3):S9–S17, 2002
40. Behrendt D, Granz P: Endothelial function: from vascular biology to clinical application. *Am J Cardiol* 90 (Suppl.):40L–48L, 2002
41. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C: Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 295:1681–1687, 2006
42. Ceriello A: Impaired glucose tolerance and cardiovascular disease: the possible role of post-prandial hyperglycemia. *Am Heart J* 147:803–807, 2004
43. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820, 2001
44. Ceolotto G, Gallo A, Miola M, Sartori M, Trevisan R, Del Prato S, Semplicini A, Avogaro A: Protein kinase C activity is acutely regulated by plasma glucose concentration in human monocytes in vivo. *Diabetes* 48:1316–1322, 1999
45. Beisswenger PJ, Howell SK, O'Dell RM, Wood ME, Touchette AD, Swergold BS: alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care* 24:726–732, 2001
46. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, O'Leary DH, Genuth S, Diabetes Control and Complications Trial, Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group: Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 348: 2294–2303, 2003
47. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B, Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group: Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353:2643–2653, 2005
48. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III): Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106:3143–3421, 2002
49. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinonen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, for the Finnish Diabetes Prevention Study Group: Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343–1350, 2001
50. Diabetes Prevention Program Research Group: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393–403, 2002
51. Diabetes Prevention Program Research Group: Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 54:1566–1572, 2005
52. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, Fowler S, Diabetes Prevention Program Research Group: The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 142:611–619, 2005
53. Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjostrom L: XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 27:155–161, 2004
54. Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J, RIO-North America Study Group: Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 295:761–775, 2006
55. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S: Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365:1389–1397, 2005
56. Despres JP, Golay A, Sjostrom L, for the RIO-Lipids study group: Effect of rimonabant on body weight and the metabolic syndrome in overweight patients. *N Engl J Med* 353:2121–2134, 2005
57. Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF, RIO-Diabetes Study Group: Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 368:1660–1672, 2006
58. DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators, Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P,

- Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR: Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 368:1096–1105, 2006
59. Sartor G, Schersten B, Carlström S, Melander A, Nordén A, Persson G: Ten-year follow-up of subjects with impaired glucose tolerance: prevention of diabetes by tolbutamide and diet regulation. *Diabetes* 29: 41–44, 1980
60. Knowler WC, Sartor G, Melander A, Schersten B: Glucose tolerance and mortality, including a substudy of tolbutamide treatment. *Diabetologia* 40:680–686, 1997
61. Navigator press release: the NAVIGATOR study [article online], 2001. Available from http://www.bioportfolio.com/news/novartis_2.htm. Accessed 24 September 2004
62. Chiasson JL, Gomis R, Hanefeld H, Josse RG, Karasik A, Laakso M: The STOP NIDDM Trial Research Group: the STOP NIDDM randomised trial. *Lancet* 359: 2072–2077, 2002
63. <http://www.bermancenter.org/studies/trials/diabetes/origin.html>
64. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M, American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes: The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28:2289–2304, 2005

Insulin resistance and lipid disorders

Roberto Miccoli[†], Cristina Bianchi, Giuseppe Penno & Stefano Del Prato

[†]Author for correspondence: Department of Endocrinology & Metabolism, University of Pisa, Via Paradisa 2, 56124 Pisa, Italy ■ Tel.: +39 050 995 136 ■ Fax: +39 050 541 521 ■ rmiccoli@immr.med.unipi.it

The dyslipidemia of insulin resistance is characterized by elevated levels of triglycerides (TGs), low HDL-cholesterol and small dense LDL particles. Many of these features are affected by the reduction in insulin sensitivity, with a central role played by abnormalities in assembly and secretion of VLDL. Postprandial hyperlipidemia is common in insulin-resistant individuals, probably owing to reduced lipolysis of nascent chylomicrons. Increased exchange of HDL cholesteryl esters for TGs is associated with lipolysis of HDL-TG by hepatic lipase and this produces dysfunctional particles that are less stable than normal particles and contribute to decreased reverse cholesterol transport. On the other hand, TG accumulation has been described as dangerous for several tissues, the so-called lipotoxicity, particularly for pancreatic β -cells where it results in impairment of glucose-stimulated insulin secretion and accelerated apoptosis. Recently, islet dysfunction and loss of insulin secretion have also been associated with alterations of plasma and islet cholesterol levels. A more comprehensive appreciation of reciprocal effects of insulin resistance and atherogenic dyslipidemia should guide the physician in a more conscious therapeutic decision.

Insulin resistance is a common condition that is believed to play a main role in the pathogenesis of the metabolic syndrome (MS), obesity and Type 2 diabetes (T2DM), as well as cardiovascular disease [1]. The prevalence of all these conditions is growing at an unexpected rate, probably owing to exacerbation of insulin resistance as a consequence of increased caloric intake and decreased energy expenditure. Recent studies have suggested that lifestyle modification, based on weight reduction and increased physical activity, can prevent or delay development of T2DM and MS in high-risk subjects [2]. Weight reduction and an improvement in fitness are both associated with significant amelioration of insulin sensitivity, supporting a strong link between impaired insulin action and metabolic/cardiovascular diseases. The possibility that insulin resistance may play a central role in the clustering of multiple cardiovascular risk factors was initially proposed by Reaven when he noticed how often insulin-resistance was associated with impaired glucose tolerance, hypertension and dyslipidemia [3]. Subsequently, the mechanisms relating impaired insulin action with components of the MS have been explored. It is the purpose of this review to provide an overview of the mechanisms through which insulin resistance (and concomitant hyperinsulinemia) leads to alteration of circulating lipoproteins. However, dyslipidemia is just an aspect of a more generalized

disturbance of lipid metabolism associated with insulin resistance. Common to this condition is accretion of lipids in adipose tissue (particularly at the visceral level) as well as outside the adipose tissue (i.e., ectopic accumulation in liver, muscle, pancreas, heart and vessels). Therefore, this review will also provide a comprehensive approach to explore how ectopic lipid accumulation, lipotoxicity and altered lipoprotein metabolism may all be entangled to generate increased cardiovascular risk.

Insulin resistance & atherogenic dyslipidemia

In insulin-resistant individuals, such as those with T2DM and MS, it is common to find characteristic changes from the normal lipid and lipoprotein pattern. These changes include elevation of triglycerides (TG), reduction of HDL-cholesterol (HDL-C), a concomitant increase of ApoB and increased small dense LDL in the face of normal or slightly elevated LDL-cholesterol (LDL-C). This combination of lipid and lipoprotein alterations is associated with significant risk of cardiovascular disease so that it is referred to as 'atherogenic dyslipidemia' [4]. In spite of articulate changes in the lipid profile, as highlighted by Ginsberg *et al.*, it is the effect of insulin resistance on the assembly and secretion of VLDL, ApoB and TG – which plays a central role in the development of atherogenic dyslipidemia [5].

Keywords

β -cell failure ■ diabetes
■ insulin resistance
■ triglyceride metabolism

future
medicine part of fsg

These lipid disorders have often been associated with impaired insulin action. In population-based studies, measures of insulin action have been found to correlate in a positive manner with plasma total or VLDL-TG, and in a negative fashion with HDL-C and small dense LDL particles [6]. In the population studied by the European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), a strong association between insulin action, as measured by the euglycemic clamp technique, and TGs has been documented [7]. These associations remain significant upon adjustment for obesity, age, smoking and physical activity. Even using sophisticated techniques, such as nuclear magnetic resonance (NMR), mean particle sizes for VLDL (larger), LDL (smaller) and HDL (smaller) of insulin-resistant individuals have been found to be significantly different than those observed in insulin-sensitive subjects [8].

Abnormalities of postprandial lipoprotein metabolism have been reported in insulin-resistant individuals. Postprandial hyperlipidemia is highly prevalent in diabetic patients with both normal [9] and elevated [10–12] fasting TG concentrations. Rivellesse *et al.* also reported that in T2DM patients with normal fasting TG and optimal blood glucose control ($\text{HbA}_{1c} < 6.5\%$), a marked alteration of postprandial lipid response may occur with significantly higher VLDL, ApoB-48, ApoB-100, cholesterol and TG levels as compared with control subjects [13]. These findings highlight the role of long residence time of TG-rich lipoprotein remnants as a feature of diabetic dyslipidemia. A direct relationship between insulin resistance and postprandial lipemia has been assessed by Annuzzi *et al.* by performing hyperinsulinemic clamp studies in T2DM and control individuals [14]. As expected, the former had lower insulin sensitivity but higher postprandial TG, cholesterol and ApoB levels. Excessive postprandial lipemia is associated with multiple abnormalities in LDL and HDL particles, which may contribute to the risk of coronary artery disease in T2DM [15].

Dyslipidemia is one of the major components of MS. In subjects with MS, the prevalence of isolated hypertriglyceridemia and low HDL-C levels has been determined to occur at rates of 30 and 37%, respectively [16]. In the adult Italian population of the Lucca Cuore project [17], hypertriglyceridemia occurred at rates of 27% and 13% for male and female subjects meeting the ATP-III criteria for MS, respectively, while the prevalence of low HDL-C in both genders was quite similar (29% and 30%, respectively).

Furthermore, more than 80% of patients with both lipid abnormalities met the ATP-III definition for MS [18]. In subjects with MS, abnormalities of lipoprotein subclass profile determined by NMR are independent of age, BMI, systolic blood pressure, smoking and lipid concentrations. In these individuals, impairment in insulin sensitivity represents the main determinant of these abnormalities [19]. More recently, we have demonstrated that the typical atherogenic dyslipidemia is also present in hypertensive subjects with MS [20].

Pathophysiology of dyslipidemia associated with insulin resistance

Altered metabolism of TG-rich lipoproteins is crucial in the pathophysiology of dyslipidemia associated with insulin resistance. Alterations include increased hepatic secretion, as well as impaired clearance of VLDL and intestinally derived chylomicrons [21]. An important consequence of slow clearance is the persistence in the circulation of both VLDL, postprandial chylomicrons and partially metabolized remnant particles (FIGURE 1). Remnants include cholesterol-enriched intermediate-density lipoproteins that have been shown to confer high atherogenic risk in experimental animal models as well as in man [22].

Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins

Overproduction of VLDL, with increased secretion of TG and ApoB100, appears to be central in the etiology of increased plasma VLDL levels in patients with insulin resistance or T2DM [23]. The steps accounting for such alterations are illustrated in FIGURE 1.

Impairment of muscle glucose uptake and oxidation is a consequence of insulin resistance in muscle, while impairment of hepatic glucose production is a consequence of insulin resistance in liver – finally, resistance to insulin's suppressive action in adipose tissue is accounting for the increased lipolysis in the insulin-resistant individual. Insulin resistance at the level of the adipose tissue results in reduced glucose uptake and impaired generation of glycerol hampering intracellular nonesterified fatty acid (NEFA) re-esterification and increased lipolysis. This is further enhanced by ineffective inhibition of hormone-sensitive lipase activity. The excess of NEFA flux will then feed the liver, resulting in stimulation of TG synthesis and assembly and secretion of VLDL particles. Increase of NEFA and glucose flux to the liver have been proven to be of great relevance for hepatic VLDL production [24].

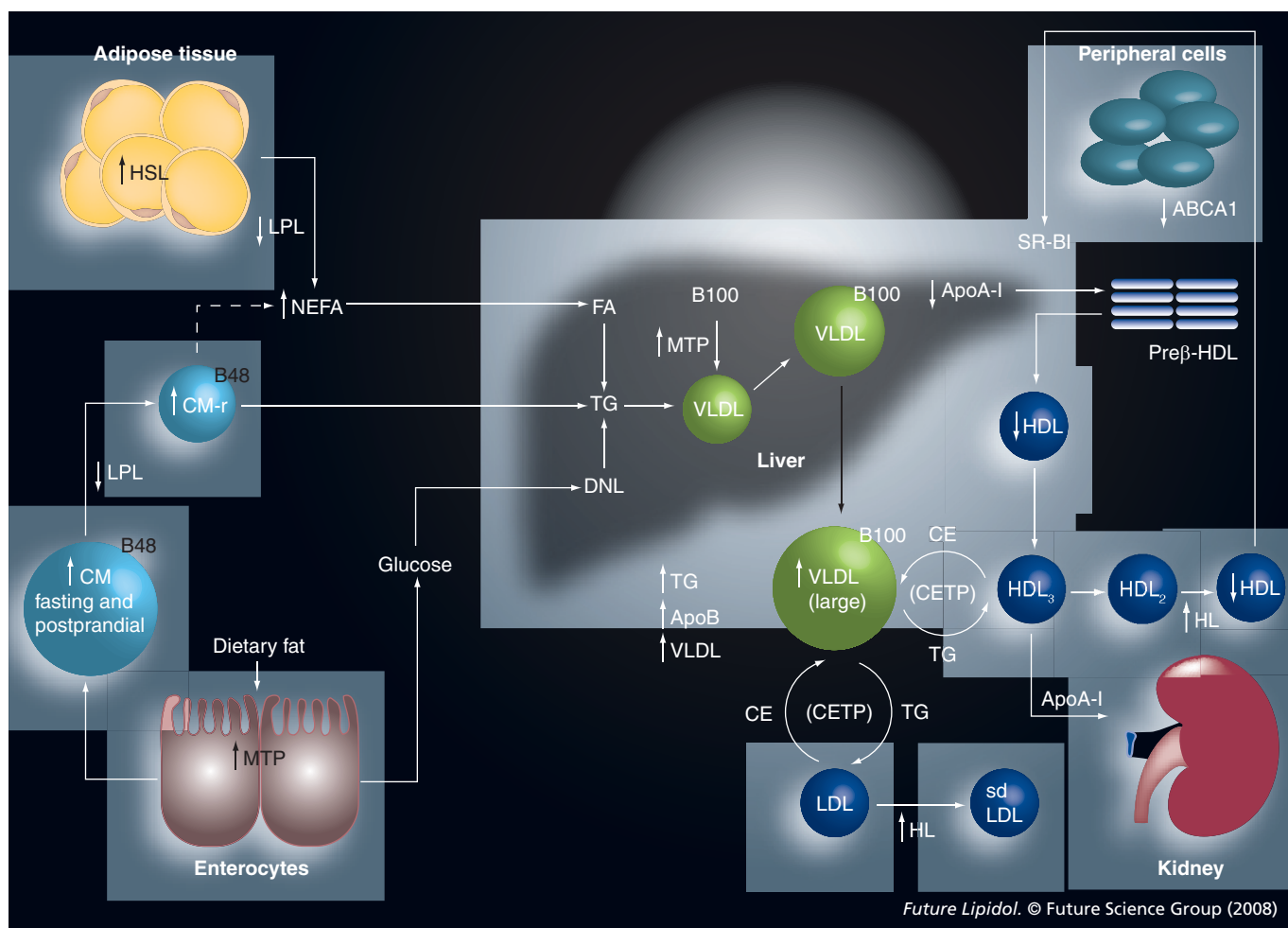


Figure 1. Mechanisms relating insulin resistance and dyslipidemia. In insulin-resistance states, enhanced lipolysis and increased fatty acid flux from adipose tissue, hypersecretion and hypocatabolism of CM and VLDL remnants, and DNL are three major sources of TG, the main substrate regulating ApoB secretion as VLDL. In the presence of increased VLDL in the plasma and normal activity of the plasma protein CETP, VLDL TG can be exchanged for LDL- and HDL-cholesterol. This exchange produces LDL particles enriched in TG, which are rapidly lipolyzed by HL, leaving smaller, denser LDL particles. The TG-rich HDL particle can undergo further modification, including hydrolysis of its TG by HL, which leads to the dissociation of the structurally important protein ApoA-I. The free ApoA-I in plasma is cleared more rapidly than ApoA-I associated with HDL particles and the number of HDL particles will be reduced. In addition, reduced cholesterol efflux from cells, in combination with lower availability of precursors of nascent HDL, contributes to decreased HDL-cholesterol concentrations.

ABCA1: Adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1; Apo: Apolipoprotein; CE: Cholesterol ester; CETP: Cholesteryl ester transfer protein; CM: Chylomicron; DNL: *De novo* hepatic lipogenesis; HL: Hepatic lipase; HSL: Hormone-sensitive lipase; LCAT: Lecithin:cholesterol acyltransferase; LPL: Lipoprotein lipase; MTP: Microsomal TG protein; NEFA: Nonesterified free fatty acid; SR-B1: Scavenger receptor B1; TG: Triglyceride.

ApoB degradation may be regulated in the endoplasmic reticulum (ER) by lipid availability, as oleic acid has a protective effect on ER degradation of ApoB by a pathway involving the proteasome in Hep G2 cells [25]. One prevalent hypothesis is that the translocation of the ApoB polypeptide across the ER membrane may be at least temporarily arrested as a result of the failure to efficiently assemble the nascent lipoprotein particle. If translation proceeds without coupling to translocation, the nascent polypeptide chain can loop out of the translocation channel into the cytosol, making it accessible to components of the

proteasomal degradation machinery. Cytosolic chaperones, including the heat-shock proteins (Hsp)70 and Hsp90, have been suggested to play a role in ApoB degradation by facilitating delivery of the ApoB polypeptide to the proteasome [26]. Post-translational mechanisms can also contribute to ApoB100 degradation at the ER level. Microsomal TG protein (MTP), a heterodimeric lipid-transfer protein necessary for assembly of ApoB-containing lipoproteins, plays a major role in the translocation of ApoB-100. Insulin seems to be an important factor in the intracellular degradation of freshly translated ApoB-100 [27], or modulation of MTP

gene expression [28]. A condition of insulin resistance may directly affect the above patterns since insulin regulation of ApoB involves the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [29]. Therefore, in an insulin-resistant state, imbalance between secretion and degradation in favor of the former, as a consequence of the inability to suppress ApoB-100 degradation, results in increased VLDL secretion [30].

Insulin resistance is commonly associated with compensatory hyperinsulinemia, which also contributes to the pathogenesis of dyslipidemia. The acute effect of insulin on VLDL kinetics in humans *in vivo* has been evaluated in few studies by different modelling approaches. Acute hyperinsulinemia induces a decrease of VLDL-TG and VLDL-ApoB production, with a greater reduction in TG than in ApoB [31]. As a consequence, insulin not only reduces the number of particles to be secreted, but also induces a shift from VLDL1 to VLDL2, a much smaller particle [32]. In T2DM, plasma TG elevation is caused by increased production of VLDL1 but not VLDL2 particles [33]. Furthermore, the circulating time of VLDL, intermediate-density lipoprotein and LDL is increased, probably due to decreased hepatic uptake [34]. Insulin resistance might lead to reduced LDL receptors, limiting remnant removal [21].

Postprandial hyperlipidemia is common in insulin-resistant individuals and this is almost certainly associated with hepatic uptake of remnants that contain more TG than remnants in normal people. Uptake of TG-rich lipoproteins stimulates VLDL assembly and secretion as the liver attempts to maintain homeostasis regarding its fatty acid and TG content: delivery of excess remnant TG will lead to increased VLDL secretion, a cycle that has been demonstrated in cultured liver cells [35] as well as in man [36].

Finally, *de novo* fatty acid synthesis (lipogenesis) in the liver accounts for another source of TGs for assembly and secretion with ApoB100. Although data in humans are limited, recent studies have demonstrated that lipogenesis can contribute to VLDL-TG – and *de novo* synthesis may be increased in individuals with obesity and insulin resistance [37,38]. This view is also supported by activation of transcription factors, such as the sterol response-element binding protein isoform-1 (SREBP1-c) [39]. This protein is a member of the basic helix–loop–helix–leucine zipper family of transcription factors that act as dimers to activate genes involved in lipid metabolism [40]. Both insulin and liver X-receptor (LXR) induce SREBP-1c transcription [39]. The effect of insulin on SREBP-1c is of relevance

since it is through this effect that hyperinsulinemia may contribute to *de novo* lipogenesis [41]. Recently, it has been reported that mice with total hepatic insulin resistance exhibit hyperglycemia without hypertriglyceridemia – a state paradoxically less severe than selective hepatic insulin resistance. Insulin cannot suppress gluconeogenesis and, thus, the liver continues to secrete glucose. Insulin also cannot activate SREBP-1c and so hepatic TGs and circulating VLDL are low. The net result is hyperinsulinemia and hyperglycemia without hypertriglyceridemia. In T2DM, selective insulin resistance has implications for therapy. It seems preferable to search agents that will improve insulin sensitivity in the pathway that leads to suppression of hepatic gluconeogenesis and enhanced peripheral glucose uptake. With such an agent, insulin levels should fall, hepatic SREBP-1c levels should decline and lipotoxicity should be averted [42]. Furthermore, LXR-mediated lipogenesis also seems to be caused by increased carbohydrate-responsive element binding protein (ChREBP) expression and activity. The transcription factor ChREBP promotes the hepatic conversion of excess carbohydrate to lipid [43].

Although increased VLDL secretion is an important mechanism leading to dyslipidemia associated with insulin resistance, it is not the only one. Removal of these particles is also involved. A reduction in postheparin lipoprotein lipase (LPL) levels has been observed in T2DM and increased chylomicrons, as can be found in insulin-resistant subjects, may compete for VLDL removal from the circulation. Hepatic uptake of VLDL remnants can also be altered owing to reduced expression of LDL receptors limiting remnant removal [5].

Metabolism of postprandial chylomicrons

After ingestion of a meal, dietary fat (i.e., TG) and cholesterol are absorbed in the cells of the small intestine and incorporated in the core of nascent chylomicrons. Similar to what happens for ApoB100 and VLDL assembly, the association of ApoB48 with dietary lipids to form chylomicrons is altered in the presence of insulin resistance. Increased ApoB48 secretion was found in an experimental animal model of insulin resistance [44], whereas intestinal lipoprotein overproduction is ameliorated by an insulin sensitizer such as rosiglitazone [45]. Reduced clearance of postprandial TG may contribute to postprandial hyperlipidemia in insulin-resistant subjects [23]. Indeed, ApoCIII synthesis is

increased under the circumstance of impaired insulin action, accounting for lower LPL action and, finally, reduced clearance of postprandial TG [46].

Whether the same mechanisms are operative in man is still unclear, but postprandial hyperlipidemia is a feature of insulin-resistant subjects. In the study by Annuzzi *et al.*, performed under condition of hyperinsulinemic clamp, no major difference was found in LPL activity in post-heparin plasma obtained 6 h after a meal ingestion in T2DM as compared with control subjects, suggesting that it is increased secretion that mainly accounts for postprandial hyperlipidemia in insulin-resistant conditions [14]. Recently, the first human data demonstrated that intestinal ApoB48-containing TG-rich lipoprotein production rate is increased in hyperinsulinemic insulin-resistant humans [47].

High-density lipoproteins

An inverse relationship between VLDL-TG and HDL has also been reported [48]. Delayed clearance of TG-rich lipoproteins leads to reduced HDL concentration by facilitation of cholesteryl-ester transfer protein (CETP)-mediated exchange between cholesterol esters (CE) in HDL and TG in VLDL. In the presence of insulin resistance, elevated CETP activity, an important determinant of HDL metabolism, results in enhanced CE transfer from HDL to TG-rich lipoproteins and in reciprocal TG transfer, producing TG-enriched HDL, together with CE-enriched VLDL and remnants [49]. HDL particles possessing a low CE: TG ratio are less stable than normal particles [48]. Furthermore, in T2DM patients, plasma activity of phospholipid-transfer protein (PLTP) and hepatic lipase (HL) are increased, contributing to low HDL-C and changes in subclass distribution [50]. Recent studies in a LIRKO mouse reported a major reduction in HDL-C levels, even in the absence of hypertriglyceridemia and CETP. Although the exact mechanism by which insulin resistance produces this effect remains to be determined, preliminary studies show that HDL clearance is normal in LIRKO mice. It appears that hepatic insulin resistance reduces HDL-C by either decreasing HDL production or promoting a shift of HDL-C to non-HDL lipoproteins [51].

Increased activity of HL on TG-enriched HDL results in smaller HDL particles, which are cleared more rapidly from circulation. Furthermore, TG-enriched HDL are intrinsically more unstable in the circulation, with ApoA-I loosely bound. Dysfunctional LPL, or reduced LPL activity, contributes to lowering

the level of HDL by reducing the availability of surface constituents of TG-rich lipoproteins that normally sequester to the plasma pool of nascent HDL particles [48].

Compositional modification of the HDL lipid core and a conformational change of ApoA-I are a driving force of functional deficiency of HDL particles in T2DM and insulin-resistant subjects; this mechanism is particularly relevant for small atheroprotective HDL3 particles. Lower levels of circulating HDL2-C, which is the more potent antiatherogenic HDL subfraction [52], are associated with fatty liver, even after adjustment for whole-body insulin resistance and circulating adiponectin [53]. Insulin may exert a direct effect on the production of ApoA-I [54] or hepatic secretion of nascent HDL [55,56]. Thus, in insulin-resistant states, there is a substantial decrease of HDL particles, especially larger HDL2 (compared with smaller HDL3), and HDL containing mostly ApoA-I (i.e., LpA-I particles). These particles are more effective than LpA-I:A-II particles in the reverse cholesterol process and, therefore, are considered more antiatherogenic. Impaired antioxidative activity with defective protection of endothelial cells from oxidized LDL (ox-LDL)-induced apoptosis of small, dense HDL is intimately related to concomitance of hyperTG, hyperinsulinemia and insulin resistance [56,57].

Supraphysiological concentrations of insulin impair cellular HDL binding, as well as HDL-mediated cholesterol efflux from fibroblasts *in vitro*, suggesting that very high levels of insulin decrease the initial step of reverse cholesterol transport [58]. Furthermore, when J774 macrophages are incubated with unsaturated NEFA, cellular cholesterol efflux is decreased, owing to diminished expression of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) [59].

Low-density lipoproteins

Under conditions of low or normal TG formation, VLDL particles are good substrates for LPL-producing LDL2 and LDL1 moieties. LDL1 and LDL2 comprise large-size LDL particles, the most avidly bound substrate of LDL receptors. In insulin-resistant subjects, TG formation increases, larger VLDL1 particles are produced and lipolysis by LPL is less efficient, leading to production of remnant particles that are further metabolized by LPL and HL to form LDL3a [60–62]. The latter are processed by CETP, shuttling TGs back to remnant particles, and by HL to form LDL3b. A final pathway is the one involving very large VLDL1 particles, which are metabolized by LPL to produce highly atherogenic remnant particles.

These can be cleared directly or metabolized by LPL and HL to the smallest LDL₄ particles. LDL₁ and LDL₂ are also known as phenotype A and LDL₃ and LDL₄ as phenotype B particles. The presence of phenotype B is a common feature of dyslipidemia associated with insulin resistance [63]. However, small dense LDL are present in insulin resistant patients, even when they show relatively normal TG, suggesting that other factors are involved. These factors comprise higher activity of HL with facilitated hydrolysis of TG in LDL, as well as increased exchange of CE and TG between LDL (or HDL) and VLDL in the presence of higher levels of circulating fatty acids. Furthermore, even in the presence of normal fasting TG levels, elevation of postprandial chylomicrons and VLDL occur in insulin resistant and T2DM patients, which may accelerate the formation of small and dense LDL particles.

Previous studies have demonstrated that the occurrence of small dense LDL may be genetically influenced [64]. Thus, a common polymorphism in the *CEPT* gene has been found to be associated with LDL particle size [65]. Furthermore, potential candidate genes that may provide a link between insulin resistance and dyslipidemia have been identified in HL and the fatty acid binding protein (*FABP*) gene 2 [66].

Finally, small LDL particles are more likely to undergo oxidative modification. Ox-LDL is less efficiently cleared from the circulation and can trigger inflammation and the atherogenic process. Predominance of small dense LDL has been associated with a three- to seven-fold increased risk for coronary artery disease.

Dysregulation of lipid metabolism & insulin resistance

Whilst current definitions may still define insulin resistance in terms of insulin effects on glucose metabolism, the last decade has seen a shift from the traditional 'gluco-centric' view of the syndrome associated with insulin resistance to an increasingly acknowledged 'lipocentric' viewpoint. The notion that lipids may act as signaling factors that regulate metabolic functions in target tissues was first suggested more than 40 years ago, when Randle *et al.* hypothesized that obesity-associated insulin resistance could be explained by substrate competition between increased circulating NEFA and glucose for oxidative metabolism in insulin-responsive cells. The importance of NEFA and lipid metabolism was also outlined by McGarry, who suggested that insulin resistance and concomitant hyperglycemia could be viewed in the context of underlying abnormalities of lipid metabolism [67]. More recently,

glucose uptake, rather than intracellular glucose metabolism, has been implicated as a rate-limiting step for NEFA-induced insulin resistance [68]. In this model, NEFA and some of their metabolites, including acyl-CoA, ceramides and diacylglycerol, have been demonstrated to serve as signaling molecules that activate protein kinases such as PKC, JNK and IKK. These kinases can impair insulin signaling by increasing inhibitory serine phosphorylation of insulin receptor substrates (IRS), the key mediators of insulin signaling, and activating an inflammatory response [68].

In such a lipocentric framework, the term lipotoxicity was introduced by Unger to describe the deleterious effect of TG accumulation in pancreatic β -cells, resulting in impaired glucose-stimulated insulin secretion and accelerated apoptosis [69,70]. The same concept (and definition) has been expanded to include the multiple effects of circulating lipids on insulin-sensitive tissue, specifically, the role of lipids in the generation and maintenance of insulin resistance.

Obviously, excess adipose tissue plays a central role in supplying excess NEFA into the circulation and, therefore, favoring the development of atherogenic dyslipidemia. We have previously demonstrated that overall NEFA flux in insulin resistant obese individuals is not solely the result of impaired insulin action at the adipocyte level, but also the result of expanded adipose tissue [71]. A significant inverse correlation has been repeatedly reported between adiposity (in particular visceral adiposity) and insulin sensitivity [72], but a significant correlation has also been reported to link insulin action with ectopic fat deposition in muscle [73] and in liver [74]. Increased fat accumulation in the liver is a marker of hepatic insulin resistance and a close correlate of all components of the MS independent of obesity [75]. The latter may evolve in nonalcoholic steatohepatitis (NASH), a condition commonly occurring in overweight/obese individuals with T2DM, dyslipidemia and hyperinsulinemia [76]. Insulin resistance has been claimed to represent the common link between NASH and the accompanying dyslipidemia and hypertension [77]. Finally, it has been hypothesized that hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), the rate-limiting enzyme in monounsaturated fatty acid synthesis necessary for assembly of VLDL particles, may be involved in the pathophysiology of fatty liver and insulin resistance in humans. High hepatic SCD1 activity index is associated with low liver fat content and high insulin sensitivity in obese subjects and it may protect from fat accumulation in the liver and insulin resistance in obesity [32].

In keeping with the lipocentric approach is the appreciation of the role of ‘metabolic’ receptors for lipids [78], such as the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the LXRs, as well as the appreciation that disturbances in the central nervous system may be well implicated in MS [79]. Still, the wide involvement of insulin-sensitive tissues in the ectopic fat deposition raises the hypothesis that a common mechanism occurring in all involved tissues may favor lipid accumulation. Both functional [80] and genetic [81,82] studies point out the potential role of impaired mitochondrial function (FIGURE 2). Impaired activation of oxidative phosphorylation may result in acyl-CoA moieties that are made available for lipid synthesis and local deposition [80]. Increasing sedentary lifestyle, excess caloric intake and the associated relative increase of fat mass probably contribute to the development of insulin resistance with age [68]. However, it has been suggested that it is not the dysfunction of adipose tissue that accounts for such a defect, rather impaired mitochondrial function tends to develop. Furthermore, at the adipocyte level, the number and activity of mitochondria may set the threshold at which NEFA are released into the circulation [83]. Although some of the mitochondrial dysfunction may represent an acquired defect, reduction in oxidative phosphorylation is likely to be a genetic alteration. Recent data indicate that nuclear-encoded genes that regulate mitochondrial biogenesis, such as PPAR- γ coactivator 1 α [81,82], AMP kinase [84] and calmodulin IV kinase [85] may represent the genetic background for insulin resistance.

As previously mentioned, the term lipotoxicity was initially employed to describe the toxic effect exerted by increased lipid availability on pancreatic islets. Of interest, lipid metabolic receptors are also likely to be implicated in the genesis of such a toxicity. Exposure to long-chain fatty acids increases PPAR- α expression and may play a role in sustaining β -cell secretory capacity [86]. However, in hyperglycemic states, PPAR- α mRNA may be suppressed and this event may be a component of glucotoxicity [87]. Although interesting, these findings may be limited to the murine model as PPAR- γ , but not PPAR- α receptors, are expressed in β -cells [88]. A major effect of PPAR- γ is played at the level of adipose tissues where they regulate fatty acid storage, cell differentiation, maturation and growth [89]. In the pancreatic islet, elevation of NEFA results in downregulation of PPAR- γ expression and impaired glucose-mediated insulin release. This effect can be almost completely prevented by concomitant incubation with a thiazolidinedione (TZD) [88].

In summary, disturbances in lipid storage and lipid mobilization are likely to be the main effects in T2DM and related conditions characterized by insulin resistance. According to this view, a spectrum of conditions, all characterized by insulin resistance and dyslipidemia, can be described spanning from massive obesity to visceral obesity to localized accumulation of adipose tissue as it occurs in lipodystrophy. The latter is, indeed, known to be associated with insulin resistance and characteristic atherogenic dyslipidemia [90].

While elevated levels of TGs and low levels of HDL-C are a common feature of patients with insulin resistance, the potential role of cholesterol in lipotoxic disease of islets has only recently been explored (FIGURE 2). Recent evidence suggests that alterations of plasma and islet cholesterol levels may contribute to islet dysfunction and loss of insulin secretion. ABCA1, which regulates islet cholesterol efflux, is essential for normal β -cell function and absence of ABCA1 results in islet cholesterol overload and impaired insulin release [91]. Several genetic alterations of cholesterol metabolism are associated with T2DM. *In vitro* studies suggest that increasing islet cholesterol can induce β -cell death and impairment of insulin secretion, while reducing islet cholesterol enhances insulin secretion [92].

Therapeutic implications

Therapeutic strategies aiming at reducing (intracellular) lipid availability in insulin-sensitive tissues, such as skeletal muscle and liver, and pharmacological modulation of the signaling pathways activated by increased lipid stores and availability, represent targets for treatment of insulin resistance and prevention of its complications. Moderate increases in physical activity in overweight to obese subjects improves insulin sensitivity in conjunction with a reduction of abdominal fat, TG levels, increased plasma HDL-C concentrations and improved oxidative capacity in muscle [93]. Diet, both in quantitative and qualitative terms, is an obvious cornerstone in the treatment of metabolic diseases. The biochemical and molecular processes linking dietary fats to insulin resistance are not completely understood, but may relate to altered membrane phospholipid fatty acid composition and membrane fluidity and stability, changes in lipogenic gene transcription, the type of fatty acids within TG and direct interference with insulin signaling [94]. In subjects with insulin resistance, replacement of saturated with unsaturated fat lowers VLDL-TG, while the effects on HDL-C are less clear. Increased unsaturated fat intake

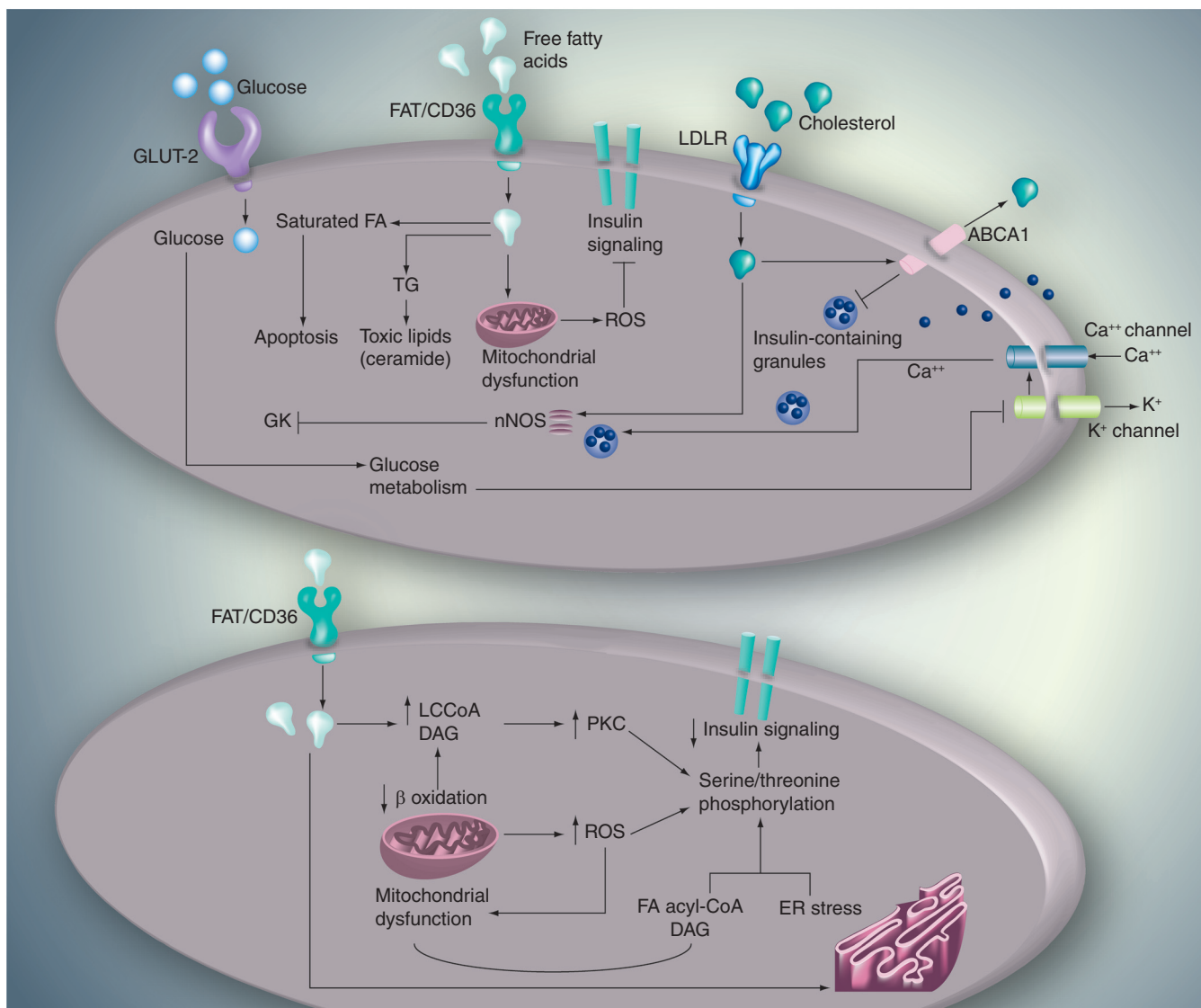


Figure 2. Link between lipids, insulin resistance and β -cell failure. (A) In skeletal muscle and liver intramyocellular LCCoA and DAG, owing to increased release of FA from adipose tissue and/or reduced mitochondrial β -oxidation, can inhibit insulin signaling through activation of PKC or serine/threonine kinase cascade. Fat accumulation increases ROS production and leads to inhibition of insulin signaling. In addition, decreased mitochondrial β -oxidation results in increased ROS generation. Mitochondrial dysfunction can increase intramyocellular lipids and insulin resistance. Excess accumulation of lipids can trigger stress of the ER. Cell-extrinsic modulators, such as endocrine and inflammatory mediators, contribute to FA-induced insulin resistance. Proinflammatory cytokines, via activation of their transduction pathways, are able to alter insulin signaling by inactivating insulin receptor substrates through serine/threonine phosphorylation (IKK, JNK and PKC- θ). **(B)** The proposed mechanisms of early β -cell failure include mitochondrial dysfunction, oxidative stress, ER stress, dysfunctional TG/FFA cycling and glucolipotoxicity. Elevated β -cell cholesterol concentrations may reduce insulin secretion by increasing dimerization of nNOS, which downregulates GK thus impairing glucose sensing. Furthermore, abnormal activity of cholesterol efflux by ABCA1 may impair insulin exocytosis.

ABCA1: Adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1; DAG: Diacylglycerol; ER: Endoplasmic reticulum; FA: Fatty acid; FFA: Free fatty acid; FAT/CD36: Fatty acid transporter; GK: Glucokinase; GLUT-2: Glucose transporter type 2; IKK: I- κ -kinase; JNK: c-Jun NH2-terminal kinase; LCCoA: Long-chain acyl-CoA; LDLR: LDL receptor; nNOS: Neural NO synthase; ROS: Reactive oxygen species; TG: Triglyceride.

is also associated with improvement in insulin sensitivity [95]. *Trans* fatty acids induce similar effects on plasma lipoprotein levels as those observed with saturated fat [95]. Long-chain ω -3 fatty acids are powerful in reducing TG levels,

although no clear-cut effect on insulin sensitivity has been observed [96]. In subjects without T2DM, no difference in insulin response to meals rich in saturated, monounsaturated, or polyunsaturated (n-3 or n-6) fatty acids have

been reported [97]. The available data support the idea that consumption of diets high in total carbohydrate does not adversely affect insulin sensitivity, while increased intake of dietary fiber appears to improve insulin action and may protect against the development of T2DM [98].

Several pharmacologic interventions have been used to treat lipid abnormalities associated with insulin resistance in patients with T2DM, MS or obesity. A possible approach is to target insulin sensitivity and adiposity rather than dyslipidemia. Selective CB1-receptor blockade with rimonabant has been demonstrated to reduce body weight and waist circumference and improves, possibly independently of weight loss, the lipid profile in high-risk patients [99]. Only 1 year of treatment with rimonabant significantly reduced triglyceride and increased HDL-C levels, without significant effect on LDL or total cholesterol [99]. It is noteworthy that the European Medicine Agency (EMA), by October 2008, has suspended the product license for rimonabant because the treatment benefits no longer outweigh its risks (psychiatric side effects).

Metformin is widely used for T2DM treatment and its most likely mechanism of action is linked to energy sensing through AMP kinase [100]. The drug exerts its main effect on the liver by increasing insulin sensitivity and inhibiting gluconeogenesis and it may result in improvement of liver function tests, although no clear histological changes have been documented [101]. Some effect on lipid profile has been claimed with a 15% reduction in plasma TG concentration [5].

A larger effect is usually obtained with TZDs. Rosiglitazone and pioglitazone are PPAR γ agonists exerting an insulin-sensitizing and anti-hyperglycemic effect [102]. Many of the beneficial actions of TZDs have been explained on the basis of lipid redistribution from ectopic and visceral fat in subcutaneous fat [103]. Owing to this effect, as well as anti-inflammatory properties, TZDs may exert a beneficial effect on NASH [104]. In subjects with NASH, the administration of pioglitazone normalized liver enzymes, decreased hepatic fat content and increased hepatic insulin sensitivity and led to histologic improvement in steatosis, ballooning necrosis and inflammation [105]. Recent studies demonstrated that PPAR γ agonists may protect β -cell function from lipotoxicity [106]. However, the effect of TZDs on plasma lipid profile remains debated, particularly since some difference exists between the two molecules [107,108]. While pioglitazone treatment lowers serum concentrations of LDL and TG, rosiglitazone does not appear to lower TG

and may result in a modest increase in LDL-C, although associated with increased HDL-C. Improvement of lipid profile in insulin-resistant subjects is obviously finalized at improving the cardiovascular risk profile. Therefore, the recent perplexities raised with respect to uncertain effect on cardiovascular events should be taken into full account [109].

Fibrates exert their hypolipidemic effect through activation of PPAR α . Their use results in a decrease in plasma TG levels (~25%) and in a moderate increase of HDL-C (~7%). Several studies do not support beneficial effects of fibrates on carbohydrate metabolism [110,111]; however, changes in TG with fibrates have been associated with improvements of insulin action in both T2DM [112] and MS subjects [113]. Based on these effects, it has been argued that combined activation of PPAR α and PPAR γ may result in a complementary and synergistic action on lipid metabolism, insulin sensitivity and inflammation. Dual PPAR α/γ agonists have, therefore, been developed. Unfortunately, development of the most advanced molecules (tesaglitazar and muraglitazar) have been stopped owing to a possible increase in cardiovascular risk [114]. New compounds are under development and even panPPAR (i.e., PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ agonists) are under assessment. The expectation is to finally have the possibility to obtain a sustained and significant increase in HDL-cholesterol after the disappointment generated by the severe side effects that seem to accompany CETP inhibitors [115]. The association of fibrate with an antiobesity drug, such as orlistat, may improve atherogenic lipid profile and reverse MS [116,117]. A significant increase (10–25%) in HDL-C can be obtained with nicotinic acid. The drug probably exerts its effect by lowering hepatic VLDL ApoB production and increasing *de novo* synthesis of ApoA-I [118]. Its use was quite limited owing to accompanying flushing accounting for 25–40% treatment discontinuation. This limitation may be overcome with the combination of nicotinic acid with the prostaglandin D(2) receptor 1 antagonist laropiprant (LRPT) [119]. Even in this case, the effect of the treatment on insulin sensitivity remains to be proven. Hyperglycemia and decreased glucose tolerance can occur in individuals with T2DM and is thought by some to result from insulin resistance consequent to the fatty acid rebound after niacin [120].

Despite the fact that elevated serum concentrations of LDL-C are not necessarily associated with insulin resistance, current guidelines recommend lowering LDL-C, followed by treating

HDL-C when TG levels are increased, as a primary target to reduce cardiometabolic risk [121]. Statins stand up as first-line therapy for aggressive lipid-lowering intervention and this approach is substantiated by clinical trials [122]. The Comparative Study with Rosuvastatin in Subjects with Metabolic Syndrome (COMETS), examined the effects of rosuvastatin and atorvastatin versus placebo on insulin resistance in patients with MS. Both statins had a marked benefit on reducing atherogenic lipoproteins and improving the ApoB:ApoA-I ratio, although no effect was apparent on insulin sensitivity [123]. However, the effects of statins on glucose homeostasis are a matter of debate, since WOSCOPS [124] showed a beneficial effect, while in other statin trials no difference in the incidence of T2DM was noticed [125,126]. Clinical trials have demonstrated that in high-risk patients, such as T2DM patients, statins reduce overall cardiovascular events by 30–40% [127]. Furthermore, the degree to which a statin may lower TGs in hypertriglyceridemic patients is correlated with its ability to lower LDL-C. Statins with greater LDL-C-lowering efficacy, such as rosuvastatin, would be expected to produce equally substantial reductions in TG [128]. Therefore, since subjects with insulin resistance have high cardiovascular risk, the use of a statin should be carefully considered.

Future perspective

Excessive caloric intake, poorly balanced diet with relative increase in saturated fat, low physical activity and subsequent increase in the prevalence of obesity seem to be the most distinct features of civilization. As a result, the risk of T2DM and its complication, as well as

cardiovascular disease, is becoming a major burden in our societies. Insulin resistance may play an important role in favoring the clustering of multiple cardiovascular risk factors in a given individual. It is certain that insulin resistance and the accompanying hyperinsulinemia can directly affect lipid metabolism at the level of several tissues (adipose tissue, muscle, liver, pancreatic β -cell etc.) as well as lipoprotein metabolism, leading to the development of atherogenic dyslipidemia. The understanding of the complex mechanism underlying these defects may represent the best opportunity for appropriate and rationale therapeutic approach. Thus, understanding these interactions may allow identification of individuals most likely to respond to specific dietary interventions, but also to design medication that may have a better safety:efficacy ratio. In the near future, it is expected that a better understanding will develop on the gene–environment relationship. In the meantime, a more comprehensive appreciation of reciprocal effects of insulin resistance and atherogenic dyslipidemia should guide the physician in a more conscious therapeutic decision.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Cause

- Insulin resistance is associated with a clustering of inter-related plasma lipid and lipoprotein abnormalities. Increased assembly and secretion of VLDL by the liver and impaired clearance of VLDL appears to be the central pathophysiologic feature of this dyslipidemia.

Consequence

- Elevated triglyceride levels, reduced HDL-cholesterol and a predominance of small, dense LDL particles are features of atherogenic dyslipidemia associated with insulin resistance.
- Ectopic fat storage and an increase in fatty acid metabolites can trigger both cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms that inhibit insulin signaling in muscle and liver.
- Dysregulation of triglyceride/free fatty acid cycling and abnormalities in intracellular cholesterol homeostasis have been linked to β -cell failure.

Conclusion

- Lifestyle modification is an essential component of any successful treatment plan of atherogenic dyslipidemia and ectopic fat storage, but drugs that diminish insulin resistance and directly alter lipoproteins are also necessary in the majority of cases.

Future perspective

- Future investigations will allow a better understanding of the mechanisms responsible for the inability of insulin to modulate VLDL metabolism in insulin-resistance states and molecular pathways linking ectopic fat storage with defective insulin signaling.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

▪ of interest

▪▪ of considerable interest

- Farag A, Karam J, Nicasio J, McFarlane SI: Prevention of Type 2 diabetes: an update. *Curr. Diab. Rep.* 7, 200–207 (2007).
- Pi-Sunyer FX: How effective are lifestyle changes in the prevention of Type 2 diabetes mellitus? *Nutr. Rev.* 65, 101–110 (2007).
- Reaven GM: Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev.* 75, 473–486 (1995).
- Grundey SM: Small LDL, atherogenic dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Circulation* 95, 1–4 (1997).
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A: Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity* 14(1), 41S–49S (2006).
- D'Agostino RB Jr, Hamman RF, Karter AJ, Mykkanen L, Wagenknecht LE, Haffner SM; Insulin Resistance Atherosclerosis Study Investigators: Cardiovascular disease risk factors predict the development of Type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 27(9), 2234–2240 (2004).
- Demonstrates that individuals with multiple cardiovascular disease risk factors are at increased risk of Type 2 diabetes (T2DM), which is only partially mediated by insulin resistance or central adiposity.**
- Baldeweg SE, Golay A, Natali A, Balkau B, Del Prato S, Coppack SW: Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Eur. J. Clin. Invest.* 30, 45–52 (2000).
- Festa A, Williams K, Hanley AJ *et al.*: Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 111(25), 3465–3472 (2005).
- Chen YD, Swami S, Skowronski R, Coulston A, Reaven GM: Differences in postprandial lipemia between patients with normal glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 172–177 (1993).
- Lewis GF, O'Meara NM, Soltys PA *et al.*: Fasting hypertriglyceridemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus is an important predictor of postprandial lipid and lipoprotein abnormalities. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 934–944 (1991).
- Syv  ne M, Hilden H, Taskinen MR: Abnormal metabolism of postprandial lipoproteins in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus is not related to coronary artery disease. *J. Lipid Res.* 35, 15–26 (1994).
- Cavallero E, Dacet C, Neufcour D, Wirquin E, Mathe D, Jacotor B: Postprandial amplification of lipoprotein abnormalities in controlled Type II diabetic subjects: relationship to postprandial lipemia and C-peptide: glucagon levels. *Metabolism* 43, 270–278 (1994).
- Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L *et al.*: Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in Type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(5), 2153–2159 (2004).
- Annuzzi G, De Natale C, Iovine C *et al.*: Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in Type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2397–2402 (2004).
- Mero N, Malmstr  m R, Steiner G, Taskinen MR, Syv  ne M: Postprandial metabolism of apolipoprotein B-48- and B-100-containing particles in Type 2 diabetes mellitus: relations to angiographically verified severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 150, 167–177 (2000).
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH: Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287, 356–359 (2002).
- Miccoli R, Bianchi C, Odoguardi L *et al.*: Prevalence of the metabolic syndrome among Italian adults according to ATP III definition. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15(15), 250–254 (2005).
- Wyszynski DF, Waterworth DM, Barter PJ *et al.*: Relation between atherogenic dyslipidemia and the Adult Treatment Program-III definition of metabolic syndrome (Genetic Epidemiology of Metabolic Syndrome Project). *Am. J. Cardiol.* 95(2), 194–198 (2005).
- Rivellese AA, Patti L, Kaufman D *et al.*: Lipoprotein particle distribution and size, insulin resistance and metabolic syndrome in Alaska Eskimos: the GOCADAN Study. *Atherosclerosis* (2008) (Epub ahead of print).
- Ghiadoni L, Penno G, Giannarelli C *et al.*: Metabolic syndrome and vascular alterations in normotensive subjects at risk of diabetes mellitus. *Hypertension* 51(2), 440–445 (2008).
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A: Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch. Med. Res.* 36, 232–240 (2005).
- Krauss RM: Triglycerides and atherogenic lipoproteins: rationale for lipid management. *Am. J. Med.* 105(1A), 58S–62S (1998).
- Ginsberg HN: Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 106, 453–458 (2000).
- Berg CE, Lavan BE, Rondinone CM: Rapamycin partially prevents insulin resistance induced by chronic insulin treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293(3), 1021–1027 (2002).
- Fisher EA, Ginsberg HN: Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 277, 17377–17380 (2002).
- Gusarova V, Caplan AJ, Brodsky JL, Fisher EA: Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones Hsp90 and Hsp70. *J. Biol. Chem.* 276, 24891–24900 (2001).
- Sparks JD, Sparks CE: Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1215, 9–32 (1994).
- Au WS, Kung HF, Lin MC: Regulation of microsomal triglyceride transfer protein gene by insulin in HepG2 cells: roles of MAPKerk and MAPKp38. *Diabetes* 52, 1073–1080 (2003).
- Phung TL, Roncone A, Jensen KL, Sparks CE, Sparks JD: Phosphoinositide 3-kinase activity is necessary for insulin-dependent inhibition of apolipoprotein B secretion by rat hepatocytes and localizes to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272, 30693–30702 (1997).
- Berti L, Mosthaf L, Kroder G *et al.*: Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 3381–3386 (1994).
- Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G: Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL ApoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes* 42, 833–842 (1993).
- Adiels M, Westerbacka J, Soro-Paavonen A *et al.*: Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance. *Diabetologia* 50(11), 2356–2365 (2007).
- Demonstrates that elevated plasma glucose can further increase hepatic fat content through multiple pathways, resulting in overproduction of VLDL1 particles and leading to the characteristic dyslipidemia associated with T2DM.**
- Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Bor  n J: Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1225–1236 (2008).
- Riches FM, Watts GF, Naoumova RP *et al.*: Hepatic secretion of very-low-density

- lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22, 414–423 (1998).
35. Craig WY, Nutik R, Cooper AD: Regulation of apoprotein synthesis and secretion in the human hepatoma Hep G2. The effect of exogenous lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 263, 13880–13890 (1988).
 36. Cohn JS, Wagner DA, Cohn SD, Millar JS, Schaefer EJ: Measurement of very low density and low density lipoprotein apolipoprotein (Apo) B-100 and high density lipoprotein ApoA-I production in human subjects using deuterated leucine. Effect of fasting and feeding. *J. Clin. Invest.* 85, 804–811 (1990).
 37. Diraison F, Moulin P, Beylot M: Contribution of hepatic *de novo* lipogenesis and reesterification of plasma nonesterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab.* 29, 478–485 (2003).
 38. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K: Hepatic *de novo* lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 43–50 (2003).
 39. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131 (2002).
 40. Richardson MC, Cameron IT, Simonis CD *et al.*: Insulin and human chorionic gonadotropin cause a shift in the balance of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) isoforms toward the SREBP-1c isoform in cultures of human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(6), 3738–3746 (2005).
 41. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL: Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell.* 6(1), 77–86 (2000).
 42. Brown MS, Goldstein JL: Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell. Metab.* 7, 95–96 (2008).
 43. Cha JY, Repa JJ: The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* 282, 743–751 (2007).
 44. Haidari M, Leung N, Mahbub F *et al.*: Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal *de novo* lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J. Biol. Chem.* 277, 31646–31655 (2002).
 45. Lewis GF: Intestinal lipoprotein overproduction, a newly recognized component of insulin resistance, is ameliorated by the insulin sensitizer rosiglitazone: studies in the fructose-fed Syrian golden hamster. *Endocrinology* 146, 247–255 (2005).
 46. Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, Davignon J, Steiner G: Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3949–3955 (2004).
 47. Duez H, Lamarche B, Uffelman KD, Valero R, Cohn JS, Lewis GF: Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1357–1363 (2006).
 48. Lewis GF, Rader DJ: New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* 96, 1221–1232 (2005).
 49. Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ: Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol. Ther.* 101, 17–38 (2004).
 50. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP: Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 1051–1069 (2003).
 51. Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C *et al.*: Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell. Metab.* 7, 125–134 (2008).
- **First study demonstrating that mice with T2DM manifest selective hepatic insulin resistance: insulin fails to suppress gluconeogenesis but continues to activate lipogenesis, producing the deadly combination of hyperglycemia and hypertriglyceridemia.**
52. Soedamah-Muthu SS, Chang YF, Otvos J, Evans RW, Orchard TJ: Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in Type 1 diabetes: a prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 46, 674–682 (2003).
 53. Kantartzis K, Rittig K, Cegan A *et al.*: Fatty liver is independently associated with alterations in circulating HDL2 and HDL3 subfractions. *Diabetes Care* 31, 366–368 (2008).
 54. Murao K, Wada Y, Nakamura T *et al.*: Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression. *J. Biol. Chem.* 273, 18959–18965 (1998).
 55. Strauss JG, Frank S, Kratky D *et al.*: Adenovirus mediated rescue of lipoprotein lipase-deficient mice: lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins is essential for HDL maturation in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 36083–36090 (2001).
 56. Kontush A, Chapman MJ: Why is HDL functionally deficient in Type 2 diabetes? *Curr. Diab. Rep.* 8, 51–59 (2008).
 57. de Souza JA, Vindis C, Hansel B *et al.*: Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. *Atherosclerosis* 197, 84–94 (2008).
 - **Demonstrates that in metabolic syndrome, ApoA-I-poor, small, dense HDL3c exert defective protection of endothelial cells from oxidised LDL- (ox-LDL) induced apoptosis, potentially reflecting functional anomalies intimately associated with abnormal neutral lipid core content.**
 58. Oppenheimer MJ, Sundquist K, Bierman EL: Down regulation of high-density lipoprotein receptor in human fibroblasts by insulin and IGF-I. *Diabetes* 38, 117–122 (1989).
 59. Wang Y, Oram JF: Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Biol. Chem.* 277, 5692–5697 (2002).
 60. Garvey WT, Kwon S, Zheng D *et al.*: Effects of insulin resistance and Type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 52, 453–462 (2003).
 61. Lund-Katz S, Laplaud S, Phillips M, Chapman MJ: Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implications for LDL receptor interaction. *Biochemistry* 37, 12867–12874 (1998).
 62. Krauss RM: Lipids and lipoproteins in patients with Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 1496–1504 (2004).
 63. Gazi I, Tsimihodimos V, Filippatos T, Bairaktari E, Tselepis AD, Elisaf M: Concentration and relative distribution of low-density lipoprotein subfractions in patients with metabolic syndrome defined according to the National Cholesterol Education Program criteria. *Metabolism* 55, 885–891 (2006).

64. Austin MA: Genetics of low-density lipoprotein subclasses. *Curr. Opin. Lipidol.* 4, 125–132 (1993).
65. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D *et al.*: Association of cholesteryl ester transfer protein-Taq1B polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1323–1329 (2000).
66. Laakso M: Gene variants, insulin resistance and dyslipidemia. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 115–120 (2004).
67. McGarry JD: What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science* 258(5083), 766–770 (1992).
68. Petersen KF, Shulman GI: Etiology of insulin resistance. *Am. J. Med.* 119(1), S10–S16 (2006).
69. Unger RH: Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44(8), 863–870 (1995).
70. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH: β -cell lipotoxicity in the pathogenesis of noninsulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte- β -cell relationships. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91(23), 10878–10882 (1994).
71. Del Prato S, Enzi G, Vigili de Kreutzenberg S *et al.*: Insulin regulation of glucose and lipid metabolism in massive obesity. *Diabetologia* 33(4), 228–236 (1990).
72. Bonora E, Del Prato S, Bonadonna RC *et al.*: Total body fat content and fat topography are associated differently with *in vivo* glucose metabolism in nonobese and obese nondiabetic women. *Diabetes* 41(9), 1151–1159 (1992).
73. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A *et al.*: Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 51(1), 144–151 (2002).
- **Demonstrates that in morbidly obese patients, lipid deprivation selectively depletes intramyocellular lipid stores and induces a normal metabolic state (in terms of insulin-mediated whole-body glucose disposal, intracellular insulin signaling and circulating leptin levels) despite a persistent excess of total body fat mass.**
74. Yki-Järvinen H: Fat in the liver and insulin resistance. *Ann. Med.* 37(5), 347–356 (2005).
75. Kotronen A, Yki-Järvinen H: Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 27–38 (2008).
76. Sass DA, Chang P, Chopra KB: Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig. Dis. Sci.* 50(1), 171–180 (2005).
77. Agarwal N, Sharma BC: Insulin resistance and clinical aspects of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatol. Res.* 33, 92–96 (2005).
78. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J: Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 261–311 (2003).
79. Obici S, Feng Z, Arduini A *et al.*: Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat. Med.* 9, 756–761 (2003).
80. Morino K, Petersen KF, Shulman GI: Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55(2), S9–S15 (2006).
81. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF *et al.*: PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately down-regulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273 (2003).
82. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S *et al.*: Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100(14), 8466–8471 (2003).
83. Maassen JA, Romijn JA, Heine RJ: Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and β -cell dysfunction: a new concept in the pathogenesis of obesity-associated Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 50, 2036–2041 (2007).
84. Zong H, Ren JM, Young LH *et al.*: AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(25), 15983–15987 (2002).
85. Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA *et al.*: Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349–352 (2002).
86. Poitout V, Briaud I, Kelpé C, Hagman D: Gluco-lipotoxicity of the pancreatic β -cell. *Ann. Endocrinol.* 65(1), 37–41 (2004).
87. Prentki M, Joly E, El-Asaad W, Roduit R: Malonyl-CoA signalling lipid partitioning and glucolipotoxicity β -cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51, S405–S413 (2002).
88. Lupi R, Del Guerra S, Marselli L *et al.*: Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPAR γ 2 in the modulation of insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286(4), E560–E567 (2004).
89. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA: PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771(8), 999–1013 (2007).
90. Oh J, Hegele RA: HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment. *Lancet Infect. Dis.* 7, 787–796 (2007).
91. Chakravarthy MV, Semenkovich CF: The ABCs of β -cell dysfunction in Type 2 diabetes. *Nat. Med.* 13, 241–242 (2007).
92. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW: Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic β -cell dysfunction. *Diabetes* 56, 2328–2338 (2007).
93. Dubé JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Sauers SE, Goodpaster BH: Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E882–E888 (2008).
- **Demonstrates a direct link between elevated serum cholesterol and reduced insulin secretion, with normal secretion restored by cholesterol depletion. The excess of cholesterol could inhibit secretion by downregulation of metabolism through increased neuronal nitric oxide synthase dimerization.**
94. Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ *et al.*: Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J. Appl. Physiol.* 100, 1467–1474 (2006).
95. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA: Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* 23(4), 447–456 (2004).
96. Rivellese AA, Maffettone A, Iovine C *et al.*: Long-term effects of fish oil on insulin resistance and plasma lipoproteins in NIDDM patients with hypertriglyceridemia. *Diabetes Care* 19(11), 1207–1213 (1996).
97. Gatti E, Noe D, Pazzucconi F *et al.*: Differential effect of unsaturated oils and butter on blood glucose and insulin response to carbohydrate in normal volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46, 161–166 (1992).
98. Bessesen DH: The role of carbohydrates in insulin resistance. *J. Nutrition* 131, 2782S–2786S (2001).
99. Després JP, Golay A, Sjöström L; Rimonaabant in Obesity-Lipids Study Group: Effects of rimonaabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* 353(20), 2121–2134 (2005).
100. Stumvoll M, Häring HU, Matthaei S: Metformin. *Endocr. Res.* 32(1–2), 39–57 (2007).
101. Chavez-Tapia NC, Barrientos-Gutierrez T, Tellez-Avila FI, Sanchez-Avila F, Montano-Reyes MA, Uribe M: Insulin sensitizers in treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J. Gastroenterol.* 12(48), 7826–7831 (2006).

102. Yki-Järvinen H: Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med.* 351(11), 1106–1118 (2004).
103. Lehrke M, Lazar MA: The many faces of PPAR γ . *Cell* 123(6), 993–999 (2005).
104. Khashab M, Chalasani N: Use of insulin sensitizers in NASH. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 36(4), 1067–1087 (2007).
105. Belfort R, Harrison SA, Brown K *et al.*: A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 355, 2297–2307 (2006).
106. Del Prato S, Bianchi C, Marchetti P: β -cell function and anti-diabetic pharmacotherapy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23(7), 518–527 (2007).
- **In this proof-of-concept study, the administration of pioglitazone led to metabolic and histologic improvement in subjects with nonalcoholic steatohepatitis.**
107. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA *et al.*: A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with Type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 28(7), 1547–1554 (2005).
108. Chiquette E, Ramirez G, DeFronzo R: A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors. *Arch. Intern. Med.* 164, 2097–2104 (2004).
109. Bolen S, Feldman L, Vassy J *et al.*: Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for Type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 147(6), 386–399 (2007).
110. Tsimihodimos V, Miltiados G, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Elisaf MS: Fenofibrate: metabolic and pleiotropic effects. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 1, 87–98 (2005).
111. Barter PJ, Rye KA: Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 39–46 (2008).
112. Avogaro A, Miola M, Favaro A *et al.*: Gemfibrozil improves insulin sensitivity and flow-mediated vasodilatation in Type 2 diabetic patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 31(7), 603–609 (2001).
113. Koh KK, Han SH, Quon MJ, Yeal Ahn J, Shin EK: Beneficial effects of fenofibrate to improve endothelial dysfunction and raise adiponectin levels in patients with primary hypertriglyceridemia. *Diabetes Care* 28(6), 1419–1424 (2005).
114. Nissen SE, Wolski K, Topol EJ: Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with Type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 294(20), 2581–2586 (2005).
115. Kastelein JJ: Refocusing on use of cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Am. J. Cardiol.* 100(11), S47–S52 (2007).
116. Filippatos TD, Gazi IF, Liberopoulos EN *et al.*: The effect of orlistat and fenofibrate, alone or in combination, on small dense LDL and lipoprotein-associated phospholipase A2 in obese patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 193, 428–437 (2007).
117. Filippatos TD, Liberopoulos EN, Kostapanos M *et al.*: The effects of orlistat and fenofibrate, alone or in combination, on high-density lipoprotein subfractions and pre- β 1-HDL levels in obese patients with metabolic syndrome. *Diabetes Obes. Metab.* 10, 476–483 (2008).
118. Kamanna VS, Kashyap ML: Mechanism of action of niacin. *Am. J. Cardiol.* 101(8A), 20B–26B (2008).
119. Paolini JF, Mitchel YB, Reyes R *et al.*: Effects of laropiprant on nicotinic acid-induced flushing in patients with dyslipidemia. *Am. J. Cardiol.* 101(5), 625–630 (2008).
120. Capuzzi DM, Morgan JM, Brusco OA Jr, Intenzo CM: Niacin dosing: relationship to benefits and adverse effects. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2, 64–71 (2000).
121. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN *et al.*: National Heart, Lung and Blood Institute; the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association: Implications of recent trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 110, 227–239 (2004).
122. Deedwania P, Barter P, Carmena R *et al.*: Treating to New Targets Investigators: Reduction of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome: analysis of the Treating to New Targets study. *Lancet* 368, 919–928 (2006).
123. Stalenhoef AF, Ballantyne CM, Sarti C *et al.*: A comparative study with rosuvastatin in subjects with metabolic syndrome: results of the COMETS study. *Eur. Heart J.* 26, 2664–2672 (2005).
- **Indicates that patients with coronary heart disease and metabolic syndrome derive incremental benefit from high-dose atorvastatin therapy, irrespective of the presence of diabetes.**
124. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N *et al.*: Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 103, 357–362 (2001).
125. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R; Heart Protection Study Collaborative Group: MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 2005–2016 (2003).
126. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR *et al.*; ASCOT investigators: Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial–Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 361, 1149–1158 (2003).
127. Jones PH: Clinical significance of recent lipid trials on reducing risk in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 99(4A), 133B–140B (2007).
128. Stein EA, Lane M, Laskarzewski P: Comparison of statins in hypertriglyceridemia. *Am. J. Cardiol.* 81(Suppl. 4A), 66B–69B (1998).

Affiliations

- Roberto Miccoli, MD, PhD
Department of Endocrinology & Metabolism, University of Pisa,
Via Paradisa 2, 56124 Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 136
Fax: +39 050 541 521
rmiccoli@immr.med.unipi.it
- Cristina Bianchi
Department of Endocrinology & Metabolism, Section of Metabolic Diseases & Diabetes, University of Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 136
Fax: +39 050 995 136
cribianchi@hotmail.com
- Giuseppe Penno
Department of Endocrinology & Metabolism, Section of Metabolic Diseases & Diabetes, University of Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 137
Fax: +39 050 541 521
pgiuse@immr.med.unipi.it
- Stefano Del Prato
Department of Endocrinology & Metabolism, Section of Metabolic Diseases & Diabetes, University of Pisa, Italy
Tel.: +39 050 995 103
Fax: +39 050 541 521
delprato@immr.med.unipi.it

Serum gamma-glutamyltransferase levels are related to insulin sensitivity and secretion in subjects with abnormal glucose regulation

Cristina Bianchi
Giuseppe Penno
Isabella Crisci
Giuseppe Daniele
Annalisa Agostini
Stefano Del Prato
Roberto Miccoli*

Department of Endocrinology and Metabolism, University of Pisa, Pisa, Italy

*Correspondence to:
Roberto Miccoli, Department of Endocrinology and Metabolism, Section of Diabetes, Ospedale Cisanello, Via Paradisa 2, 56126 Pisa, Italy.
E-mail: rmiccoli@immr.med.unipi.it

Abstract

Background To test the association between gamma-glutamyltransferase level and glucose regulation.

Methods We performed a cross-sectional analysis of 500 subjects [199 men/301 women, age 47 ± 11 years, body mass index (BMI) 28.6 ± 5.5 kg/m²] referred to Diabetes Clinics because of potential risk of type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Results The prevalence of all glucose intolerance categories was higher in the top quartile of gamma-glutamyltransferase than in the first. Subjects with normal glucose tolerance showed lower gamma-glutamyltransferase levels compared with those with impaired glucose tolerance (IGT), impaired fasting glucose (IFG)+IGT and T2DM (ANOVA, $p < 0.0001$), but not those with IFG. Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) increased with increasing levels of gamma-glutamyltransferase, while the insulinogenic index/HOMA-IR ratio decreased. In an age- and sex-adjusted analysis, the top gamma-glutamyltransferase quartile was independently associated with IFG+IGT [odds ratio (OR) 2.41; 95% confidence interval (CI): 1.13–5.15] and T2DM (OR 2.77; 95% CI: 1.47–5.22). After further adjustment for BMI, alcohol intake, family history of diabetes, cigarette smoking and physical activity, the top quartile of gamma-glutamyltransferase remained an independent predictor of IFG+IGT (OR 2.62; 95% CI: 1.13–6.07) and T2DM (OR 2.39; 95% CI: 1.20–4.76). Only when transaminases and HOMA-IR have been added to the model, the top quartile of gamma-glutamyltransferase resulted no more independently associated to IFG+IGT or T2DM.

Conclusions Gamma-glutamyltransferase is closely related to insulin resistance, reduced beta-cell function and deterioration of glucose tolerance. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords glucose regulation; gamma-glutamyltransferase; insulin resistance

Introduction

Serum gamma-glutamyltransferase has been commonly used as a marker of alcohol consumption and/or liver disease [1]. Recently, it has been also proposed as a marker of oxidative stress [2]. Gamma-glutamyltransferase plays an important role in antioxidant systems by maintaining intracellular concentrations of glutathione. Therefore, increased

Received: 14 March 2009
Revised: 17 December 2009
Accepted: 26 January 2010

serum gamma-glutamyltransferase levels may identify individuals exposed to persistent oxidative stress [2].

Population-based studies have shown that serum gamma-glutamyltransferase levels, even within the reference intervals, are associated with cardiovascular risk factors and traits of the metabolic syndrome [3–5]. Moreover, serum gamma-glutamyltransferase level could predict the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in longitudinal studies [6–8].

Nonetheless, to our knowledge, no studies have evaluated serum gamma-glutamyltransferase levels with respect to glucose tolerance. Therefore, we performed a cross-sectional study to explore potential associations between serum gamma-glutamyltransferase concentration and glucose tolerance as well as estimates of insulin sensitivity and beta-cell function.

Patients and methods

A total of 500 subjects, screened at Diabetes Section of the University Hospital of Pisa (Italy) for T2DM, were recruited over a 2-year period. After giving a written informed consent, a standardized medical history (including alcohol consumption) and physical examination were obtained in subjects before performing an oral glucose tolerance test (OGTT). Height, weight and waist circumference (at the umbilicus level with subjects in their standing position) were measured, and body mass index (BMI) calculated as kg/m^2 . Two blood pressure measurements were taken with a standard mercury sphygmomanometer with subjects on a recumbent position for at least 15 min and mean value calculated for subsequent analysis. All studies were performed in the morning after 12-h overnight fasting and smoking withdrawal.

Upon referral to our Metabolic Unit, a teflon catheter was inserted in antecubital vein for blood sample drawing and kept patent by saline solution dripping. Plasma glucose, insulin and C-peptide concentrations, serum lipid profile and glycated haemoglobin [haemoglobin A1c (HbA1c)] were measured at baseline. Plasma glucose and C-peptide concentrations were also measured at 15, 30, 60, 90, 120 min after a 75-g oral glucose load (OGTT). All biochemical parameters were determined by standard methods on Roche-Modular Autoanalyzer (Milan, Italy). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated according to the Friedewald formula. HbA1c was measured by HPLC (Biorad, Italy), while insulin and C-peptide were determined by immunoradiometric assay.

All individuals with a history of smoking were considered as current smokers, while non-smokers were those who never smoked. All subjects exercising at least 30 min/day were considered as physically active.

The OGTT results were interpreted according to the American Diabetes Association 1997 criteria [9] generating four glucose tolerance categories: normal glucose tolerance, impaired fasting glucose (IFG),

impaired glucose tolerance (IGT) and newly diagnosed T2DM. Based on the NCEP-ATPIII criteria [10], metabolic syndrome was diagnosed in all subjects meeting three or more of the following criteria: fasting glucose ≥ 6.1 mmol/L, waist circumference > 102 cm in men and > 88 cm in women; blood pressure $\geq 130/85$ mmHg or current anti-hypertensive treatment; serum triglycerides of at least ≥ 1.69 mmol/L or fibrates use; serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) < 1.04 mmol/L in men and < 1.29 mmol/L in women.

The area under the curve (AUC) for glucose during OGTT was calculated using the trapezoidal rule [11]. HOMA-IR index was calculated [fasting insulin (mU/L) \times fasting plasma glucose (mmol/L)/22.5] as described by Matthews *et al.* [12]. The insulinogenic index was calculated as a modification of the original proposal [13], since plasma C-peptide was used instead of plasma insulin concentration. Beta-cell performance was then estimated by normalization of the insulinogenic index by HOMA-IR [14].

For data analysis, we included only subjects ($n = 489$) with serum transaminases [aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)] and gamma-glutamyltransferase levels < 100 U/L, with negative tests for hepatitis B or C virus infection, and with alcohol consumption < 30 g/day. The study population was then sub-divided into quartiles of serum gamma-glutamyltransferase levels and clinical characteristics of each quartile compared.

Data are given as mean \pm SD. Non-parametric statistics was used to compare categorical variables, while analysis of variance (ANOVA) was employed to test differences in continuous variables among groups. Three multivariate logistic regression models were used to calculate odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) of glucose tolerance abnormalities for each quartile of serum gamma-glutamyltransferase level, using the lowest quartile as the reference one. In model 1, data were adjusted for age and sex. In model 2, they were further adjusted for family history of diabetes, smoking, alcohol intake, physical activity and BMI. Finally, a complete model with adjustment for AST, ALT and HOMA-IR (model 3) was used. P values < 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the StatView software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

Out of 500 subjects, 489 met the inclusion criteria. The anthropometric and biochemical features of the study population are shown in Table 1.

Mean values of BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, fasting plasma glucose, HbA1c, total- and LDL-C, triglycerides, AST and ALT progressively increased throughout gamma-glutamyltransferase

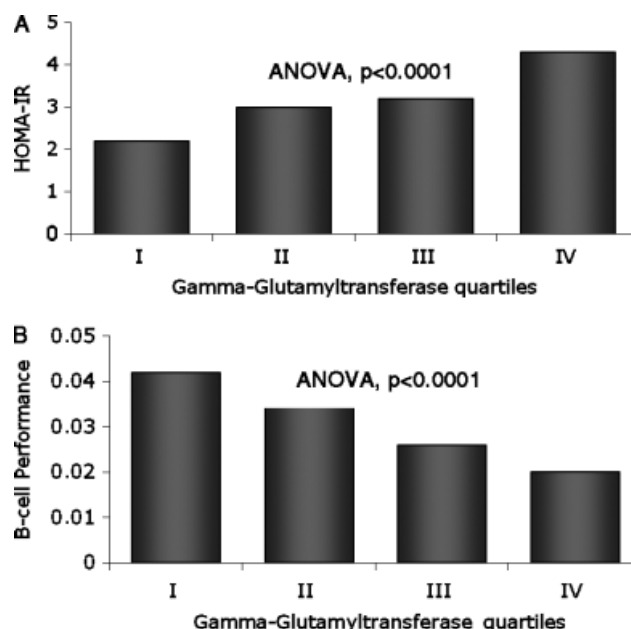
Table 1. Clinical and biochemical features of subjects included in the study

| | Mean \pm standard deviation |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Age (years) | 47 \pm 11 |
| Smokers (%) | 21 |
| Physical activity (%) | 33 |
| BMI (kg/m ²) | 28.6 \pm 5.5 |
| Waist circumference (cm) | 102 \pm 13 |
| Systolic blood pressure (mmHg) | 128 \pm 16 |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 80 \pm 11 |
| Fasting plasma glucose (mmol/L) | 5.4 \pm 0.8 |
| HbA1c (%) | 5.6 \pm 0.5 |
| Total-cholesterol (mmol/L) | 5.39 \pm 1.04 |
| LDL-cholesterol (mmol/L) | 3.39 \pm 1.01 |
| HDL-cholesterol (mmol/L) | 1.42 \pm 0.52 |
| Triglycerides (mg/dL) | 1.63 \pm 1.38 |
| ALT (U/L) | 26 \pm 14 |
| AST (U/L) | 21 \pm 7 |
| Gamma-glutamyltransferase (U/L) | 25 \pm 17 |

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; HbA1c, haemoglobin A1c; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein.

quartiles and they were all significantly higher in subjects in the top quartile compared with those in the first quartile, while HDL-C was lower (Table 2). Accordingly, the prevalence of metabolic syndrome was higher in the top quartile of gamma-glutamyltransferase as compared to the first one (50.8 *versus* 13.7%, $p < 0.0001$). A positive correlation was found between serum gamma-glutamyltransferase levels and those of AST ($r = 0.36$; $p < 0.0001$) and ALT ($r = 0.50$; $p < 0.0001$).

The AUC glucose and HOMA-IR values increased with increasing levels of gamma-glutamyltransferase (ANOVA,

**Figure 1.** HOMA-IR values (panel A) and beta-cell performance (panel B) by gamma-glutamyltransferase quartiles

$p < 0.0001$ for both), while beta-cell performance (insulinogenic index/HOMA-IR ratio) decreased (ANOVA, $p < 0.0001$) (Table 2 and Figure 1).

Based on the OGTT results, 4.5% of the study population had IFG, 19% IGT, 8% both IFG and IGT and 12.5% newly diagnosed T2DM. The prevalence of all impaired glucose categories (IFG, IGT and IFG+IGT) was higher in the top gamma-glutamyltransferase quartile as compared to the first one (IFG 5.9 *versus* 4.0%;

Table 2. Clinical and biochemical features by gamma-glutamyltransferase quartiles

| | Gamma-glutamyltransferase | | | | p^* |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-----------|
| | I quartile (<14) | II quartile (14–20) | III quartile (21–33) | IV quartile (>33) | |
| Age (years) | 41 \pm 12 | 48 \pm 11 | 49 \pm 11 | 50 \pm 10 | <0.0001 |
| Smokers (%) | 17 | 23 | 25 | 18 | n.s. |
| Physical activity (%) | 37 | 34 | 33 | 27 | n.s. |
| BMI (kg/m ²) | 26.9 \pm 6.2 | 27.8 \pm 4.9 | 29.8 \pm 5.0 | 30.0 \pm 5.5 | <0.0001 |
| Waist circumference (cm) | 97 \pm 15 | 100 \pm 11 | 104 \pm 12 | 106 \pm 12 | <0.0001 |
| Systolic blood pressure (mmHg) | 120 \pm 14 | 130 \pm 17 | 129 \pm 14 | 133 \pm 14 | <0.0001 |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 76 \pm 9 | 80 \pm 12 | 81 \pm 12 | 82 \pm 11 | <0.0005 |
| Fasting plasma glucose (mmol/L) | 5.00 \pm 0.61 | 5.38 \pm 0.78 | 5.49 \pm 1.00 | 5.72 \pm 0.78 | <0.0001 |
| HbA1c (%) | 5.39 \pm 0.4 | 5.66 \pm 0.5 | 5.73 \pm 0.5 | 5.81 \pm 0.5 | <0.0001 |
| Total-cholesterol (mmol/L) | 5.05 \pm 0.98 | 5.46 \pm 1.04 | 5.39 \pm 0.91 | 5.62 \pm 1.04 | <0.0001 |
| LDL-cholesterol (mmol/L) | 3.11 \pm 0.96 | 3.50 \pm 0.96 | 3.37 \pm 0.98 | 3.63 \pm 1.04 | <0.001 |
| HDL-cholesterol (mmol/L) | 1.53 \pm 0.41 | 1.45 \pm 0.39 | 1.40 \pm 0.60 | 1.32 \pm 0.60 | <0.02 |
| Triglycerides (mmol/L) | 1.07 \pm 0.58 | 1.46 \pm 0.88 | 1.89 \pm 2.07 | 2.15 \pm 1.32 | <0.0001 |
| AST (U/L) | 18 \pm 7 | 20 \pm 5 | 22 \pm 6 | 25 \pm 8 | <0.0001 |
| ALT (U/L) | 19 \pm 10 | 23 \pm 9 | 28 \pm 12 | 38 \pm 15 | <0.0001 |
| Fasting c-peptide (ng/mL) | 1.8 \pm 0.9 | 2.2 \pm 1.0 | 2.5 \pm 1.0 | 2.9 \pm 1.4 | <0.0001 |
| HOMA-IR | 2.18 \pm 1.83 | 3.03 \pm 2.93 | 3.22 \pm 2.07 | 4.33 \pm 3.04 | <0.0001 |
| Beta-cell performance | 0.041 \pm 0.034 | 0.034 \pm 0.072 | 0.023 \pm 0.021 | 0.017 \pm 0.015 | <0.0001 |
| AUC glucose (mmol/L/120 min) | 884 \pm 220 | 1015 \pm 253 | 1068 \pm 256 | 1138 \pm 245 | <0.0001 |
| IGR (%) | 21.8 | 44.1 | 48.0 | 63.5 | <0.0001 |
| Metabolic syndrome (%) | 14 | 36 | 39 | 51 | <0.0001** |

AUC, area under the curve; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; HbA1c, haemoglobin A1c; HDL, high-density lipoprotein; IGR, impaired glucose regulation; LDL, low-density lipoprotein; n.s., not significant.

*Difference between I and IV quartiles by one-way ANOVA.

** χ^2 test.

IGT 22.0 *versus* 12.9%; IFG+IGT 12.7 *versus* 0.8%; T2DM 22.9 *versus* 4.0%; all $p < 0.0001$). Moreover, serum gamma-glutamyltransferase levels increased with the deterioration of glucose tolerance (21 ± 15 U/L; 28 ± 22 U/L; 27 ± 15 U/L; 32 ± 17 U/L; 34 ± 21 U/L in normal glucose regulation, IFG, IGT, IFG+IGT and T2DM, respectively; ANOVA, $p < 0.0001$).

In the age- and sex-adjusted logistic regression analysis, the top gamma-glutamyltransferase quartile was independently associated to IFG+IGT (OR 2.41; 95% CI: 1.13–5.15) and T2DM (OR 2.77; 95% CI: 1.47–5.22). After additional adjustment for BMI, alcohol intake, family history of diabetes, cigarette smoking and physical activity, the top quartile of gamma-glutamyltransferase remained an independent predictor of IFG+IGT (OR 2.62; 95% CI: 1.13–6.07) and T2DM (OR 2.39; 95% CI: 1.20–4.76). Such a predictive value was lost when transaminases and HOMA-IR were added into the model. The relationship between gamma-glutamyltransferase (top quartile) and prevalent IFG+IGT remained evident even in individuals with serum AST and ALT concentrations below the reference value (<45 U/L), with an OR of 2.47 (95% CI: 1.10–5.52) in model 1 and 2.70 (95% CI: 1.10–6.64) in model 2.

Discussions

In this cross-sectional study, performed in subjects at high risk of T2DM, serum gamma-glutamyltransferase concentrations within the high-normal range were associated with impairment of glucose tolerance. Serum gamma-glutamyltransferase levels, indeed, were higher, although still normal, in subjects with abnormalities in glucose tolerance and the prevalence of each glucose intolerance category increased as a function of serum gamma-glutamyltransferase levels. This association was confirmed in multivariate analyses. After adjustment for potential confounders, serum gamma-glutamyltransferase remained independently associated with IFG+IGT and newly diagnosed T2DM, although, an independent contribution of serum gamma-glutamyltransferase to glucose intolerance was lost when serum AST and ALT levels were included in a more comprehensive model. It should be noted, however, that a strong correlation was found between serum gamma-glutamyltransferase and liver enzyme levels.

To the best of our knowledge, this is the first study reporting an association between serum gamma-glutamyltransferase levels and the full range of glucose tolerance abnormalities. The Mexico City Diabetes Study [15] has previously shown an independent association between serum gamma-glutamyltransferase levels and both prevalent and incident IGT (OR 1.8; 95% CI 1.2–2.8). More recently, an increase in serum gamma-glutamyltransferase concentration along with an increase in fasting plasma glucose from <5.55 to 6.9 mmol/L has been reported in the Taiwanese population [16]. In a sub-group of non-diabetic women from the British

Women's Health and Heart Study, the investigators have reported an increase in fasting plasma concentrations of insulin and glucose as well as HbA1c across tertiles of ALT and gamma-glutamyltransferase distribution (p for trend <0.001) [17]. Expanding these observations, we now report that subjects in the highest quartile of the serum gamma-glutamyltransferase distribution had indeed higher fasting plasma glucose levels, HbA1c, AUC glucose as well as worse insulin sensitivity and beta-cell performance.

In our analysis, serum gamma-glutamyltransferase levels were tightly associated with HOMA-R and estimated insulin secretion, i.e. the core T2DM defects. A relationship between serum gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance has been previously reported in Pima Indians [5,18], a population characterized by marked impairment of insulin action and very high T2DM prevalence [19]. However, in the same ethnic group, baseline gamma-glutamyltransferase concentrations were not different between normal glucose regulation and IGT individuals, nor, in a longitudinal analysis, between progressors and non-progressors from normal glucose tolerance to T2DM [20]. Also, there was no association between serum gamma-glutamyltransferase and changes in acute insulin response or fasting plasma insulin levels [20]. This finding is at variance with our observation of an inverse relationship between serum gamma-glutamyltransferase levels and beta-cell performance in our high-risk subjects for T2DM. Several factors beside ethnic specificity should be taken into consideration to account for this discrepancy including differences in the methods used to explore insulin action and secretion used in the two studies as well as the type of studies: longitudinal the one in the Pima Indians, cross-sectional in our case.

The mechanism(s) responsible for the association between serum gamma-glutamyltransferase levels and glucose tolerance remains largely unknown. Serum gamma-glutamyltransferase levels are commonly used as marker for alcohol consumption and/or liver disease [1], but neither alcohol intake nor hepatic dysfunction could account for the observed relationship between gamma-glutamyltransferase and T2DM. High serum gamma-glutamyltransferase concentrations may reflect fat deposition in liver as it often occurs in the presence of insulin resistance [21] and/or T2DM [22,23]. We have no direct assessment (i.e. imaging) of liver steatosis in our population. Nonetheless, given the reported correlation between serum transaminase levels and fatty liver [24], we may speculate that a relationship between serum gamma-glutamyltransferase and impaired glucose tolerance may be there since a relationship was found even in individuals with serum AST and ALT concentrations within the normal range. To further support this possibility is the observation that the predictive power of serum gamma-glutamyltransferase is lost when serum AST and ALT levels <100 U/L are introduced in the model. A similar finding has been reported in a prospective study on the association with T2DM incidence [7].

Another possible mechanism explaining the relationship between gamma-glutamyltransferase and T2DM is that gamma-glutamyltransferase may reflect ongoing inflammatory processes. From this point of view, an association between serum gamma-glutamyltransferase and serum C-reactive protein levels has been previously described [25–27]. Several studies have shown that pro-inflammatory cytokines contribute to development and maintenance of insulin resistance [28]. Moreover, Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) studies [7,29,30] suggested that oxidative stress may provide the link among T2DM, inflammation and serum gamma-glutamyltransferase levels.

T2DM progression has been also linked to oxidative stress [31] due to damage of lipids and DNA and reduced anti-oxidative protection [32]. With respect to this, it is noteworthy that mild alterations of glucose metabolism, such as IFG and IGT, are sufficient to generate oxidative stress that contributes to pancreatic beta-cell dysfunction, insulin resistance and, therefore, progression of hyperglycaemia [33]. Therefore, elevated gamma-glutamyltransferase levels may reflect a defensive response to oxidative stress.

Finally, chronic exposure to environmental xenobiotics, such as organic pollutants, may provide another potential link between gamma-glutamyltransferase levels and the risk of T2DM [34]. A striking dose-response relations between serum concentrations of xenobiotics and the prevalence of diabetes was found in the National Health and Nutrition Examination Survey Metabolism [35]. Xenobiotic metabolism generates glutathione conjugates and activates intracellular glutathione re-synthesis, a process that can be monitored by serum gamma-glutamyltransferase levels, accounting for the relationship between the circulating levels of the enzyme and the degree of glucose tolerance.

Serum gamma-glutamyltransferase levels have been also associated with cardiovascular disease [36,37]. In agreement with previous studies [3,4,7,38], we found that serum gamma-glutamyltransferase concentrations within high-normal range are strongly and positively associated with poor cardiovascular risk profile, i.e. higher plasma glucose, LDL-C, triglyceride levels and blood pressure, low HDL-C concentration and higher prevalence of metabolic syndrome.

In interpreting our data, a limitation should be considered: the examined sample is not representative of the general population, as participants underwent a diabetes screening because of the presence of predisposing factors. For this reason, the prevalence of impaired glucose regulation and unknown T2DM is likely to be overestimated as compared to the general population. If any, however, this should strengthen our conclusion because one could expect in the general population to increase the distribution of both serum gamma-glutamyltransferase levels and glucose tolerance.

In conclusion, gamma-glutamyltransferase is closely related to higher risk of altered glucose metabolism, is associated with estimates of insulin resistance and

reduced beta-cell function, as well as worse cardiovascular risk profile. Whether serum gamma-glutamyltransferase levels may provide independent and differential risk estimate in people with normal liver function and early metabolic abnormalities on top and beyond of other liver parameters will require specific evaluation.

Conflict of interest

S.D.P. has served on an advisory panel for Novartis Pharmaceuticals, Merck & Co., Roche Pharmaceuticals, Roche Diagnostics Corporation, Pfizer Inc., Eli Lilly and Co., Amylin Pharmaceuticals Inc. and Mannkind Corporation; has received research support from Merck & Co., Pfizer Inc., Eli Lilly and Co. and Sanofi-Aventis; and is a member of the speaker bureau for GlaxoSmithKline, Sanofi-Aventis and Novartis Pharmaceuticals. C.B. is a part-time consultant of Eli Lilly and Co. The other authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Teschke R, Brand A, Strohmeyer G. Induction of hepatic microsomal gamma-glutamyltransferase activity following chronic alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; **75**: 718–724.
2. Lim JS, Yang JH, Chun BY, Kam S, Jacobs DR Jr, Lee DH. Is serum gamma-glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2004; **37**: 1018–1023.
3. Kim DJ, Noh JH, Cho NH, *et al.* Serum gamma-glutamyltransferase within its normal concentration range is related to the presence of diabetes and cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 2005; **22**: 1134–1140.
4. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004; **27**: 1427–1432.
5. Yokoyama H, Hirose H, Moriya S, Saito I. Significant correlation between insulin resistance and serum γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activity in non-drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; **26**: 91S–94S.
6. Perry LJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective study of serum gamma-glutamyltransferase and risk of NIDDM. *Diabetes Care* 1998; **21**: 732–737.
7. Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, Steffers M. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Clin Chem* 2003; **49**: 1358–1366.
8. Cho NH, Jang HC, Choi SH, *et al.* Abnormal liver function test predicts type 2 diabetes: a community-based prospective study. *Diabetes Care* 2007; **30**: 2566–2568.
9. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; **20**: 1183–1197.
10. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; **285**: 2486–2497.
11. Purves RD. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J Pharmacokin Biopharm* 1992; **20**: 211–227.
12. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance

- and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–419.
13. Tura A, Kautzky-Willer A, Pacini G. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; **72**: 298–301.
 14. Bergman RN, Ader M, Huecking K, Van Citters G. Accurate assessment of β -cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes* 2002; **51**(Suppl. 1): S212–S220.
 15. Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, *et al.*; Mexico City diabetes study. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 2005; **28**: 1757–1762.
 16. Hsiao JY, Wang CL, Hsia PJ, *et al.* Decreased insulin secretion and insulin sensitivity are associated with liver function in subjects with fasting glucose between 100 and 109 mg/dL in Taiwanese population. *Pancreas* 2007; **35**: 343–347.
 17. Fraser A, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. A comparison of associations of alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase with fasting glucose, fasting insulin, and glycated transferrin in women with and without diabetes. *Hepatology* 2007; **46**: 158–165.
 18. Ortega E, Koska J, Salbe AD, Tataranni PA, Bunt JC. Serum γ -glutamyl transpeptidase is a determinant of insulin resistance transferring of adiposity in Pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 1419–1422.
 19. Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev* 1990; **6**: 1–27.
 20. Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, *et al.* High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; **51**: 1889–1895.
 21. Marchesini G, Forlani G. NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology* 2002; **35**: 497–499.
 22. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; **50**: 1844–1850.
 23. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, *et al.* NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; **35**: 373–379.
 24. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; **22**: 437–443.
 25. Kerner A, Avizohar O, Sella R, *et al.* Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein. Possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 193–197.
 26. Lee DH, Jacobs DR Jr. Association between serum gamma glutamyltransferase and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005; **178**: 327–330.
 27. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008; **582**: 97–105.
 28. Lee DH, Gross M, Jacobs DR. The association of serum carotenoids and tocopherols with gamma glutamyltransferase: the CARDIA study. *Clin Chem* 2004; **50**: 582–588.
 29. Lee DH, Steffen LM, Jacobs DR. Association between serum gamma-glutamyltransferase and dietary factors: CARDIA study. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**: 600–605.
 30. Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, Marsik C, MacAllister RJ, Wolzt M. Inflammation-induced vasoconstrictor hyporeactivity is caused by oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**: 1656–1662.
 31. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; **17**: 189–212.
 32. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000; **26**: 163–176.
 33. Song F, Jia W, Yao Y, *et al.* Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2007; **112**: 599–606.
 34. Lee DH, Steffen MW, Jacobs DR Jr. Can persistent organic pollutants explain the association between serum gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes? *Diabetologia* 2008; **51**: 402–407.
 35. Lee DH, Lee IK, Song K, *et al.* A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* 2006; **29**: 1638–1644.
 36. Ruttman E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H, Vorarlberg Health Monitoring and Promotion Program Study Group. Gamma glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiologic investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation* 2005; **112**: 2130–2137.
 37. Jousilahti P, Rastenyte D, Tuomilehto J. Serum gamma-glutamyl transferase, self-reported alcohol drinking, and the risk of stroke. *Stroke* 2000; **31**: 1851–1855.
 38. Miura K, Nakagawa H, Nakamura H, *et al.* Serum gamma-glutamyl transferase level in predicting hypertension among male drinkers. *J Hum Hypertens* 1994; **8**: 445–449.